POLITECNICO DI MILANO

Scuola di Ingegneria Industriale e dell'Informazione
Corso di Laurea Magistrale in Ingegneria Biomedica

Sviluppo di un sistema di coltura bicompartimentale per lo studio *ex vivo* del *vein graft disease* in segmenti di vena safena

Relatore
Prof. Ing. Monica Soncini

Correlatori
Prof. Ing. Gianfranco Beniamino Fiore
Ing. Marco Piola

Tesi di Laurea di
Elena BRESCIANI

Anno Accademico 2011-2012

Indice

Sommario I

Abstract XII

Introduzione 1

1. Coronarie, bypass aorto-coronarico e vein graft disease 4

1.1 Le coronarie 4

1.2 Le coronaropatie: incidenza sulla popolazione ed impatto sociale 6

1.3 Trattamento delle coronaropatie: angioplastica e bypass aorto-coronarico 9

1.4 Vasi utilizzati nel bypass aorto-coronarico 11

1.4.1 Struttura e proprietà meccaniche dei vasi sanguigni 12

1.4.2 Protesi vascolari e sostituti vascolari ingegnerizzati 17

1.4.3 Arteria mammaria interna 17

1.4.4 Grande vena safena 18

1.5 Vein graft disease 19

1.6 Conclusioni 23

2. Stato dell'arte 24

2.1 Sistemi di coltura *ex vivo* per lo studio del fenomeno di arterializzazione 24

2.1.1 Sistemi statici 25

2.1.2 Sistemi dinamici 29

2.2 Conclusioni 54

3. Progetto e dimensionamento dei sistemi di coltura 57

3.1 Overview sul sistema di coltura *ex vivo* 59

3.1.1 Analisi del sistema di coltura 63

3.2 Ottimizzazione della camera di coltura 63

3.2.1 Specifiche di progetto della camera di coltura ottimizzata 63

3.2.2 Progettazione e realizzazione della camera di coltura ottimizzata 64

3.2.3 Analisi della camera di coltura ottimizzata 69

3.3 Progetto di massima del sistema bicompartimentale 71
3.3.1 Progettazione e realizzazione della camera di coltura bicompartimentale 72
3.3.2 Progettazione e realizzazione del circuito di deossigenazione 79
3.4 Visione d'insieme 99
4. Collaudi e campagna sperimentale: metodologie 102
4.1 Collaudo del sistema bicompartimentale e del circuito deossigenante 102
4.1.1 Protocollo di verifica della tenuta idraulica 103
4.1.2 Protocollo di verifica della compatibilità con il sistema di stimolazione 104
4.1.3 Collaudo del sistema di deossigenazione 104
4.2 Protocolli di messa in esercizio del sistema bicompartimentale con campioni di vena safena umana 108
4.2.1 Operazioni preliminari 108
4.2.2 Protocollo di assemblaggio del sistema in ambiente sterile 109
4.2.3 Prove di verifica della funzionalità del sistema con vena safena umana 111
4.3 Campagna sperimentale con campioni di vena safena umana 112
4.3.1 Definizione dei gruppi sperimentali 113
4.3.2 Protocollo di assemblaggio in ambiente sterile 114
4.3.3 Procedura di messa in esercizio 115
4.3.4 Analisi biologiche 115
5. Risultati 121
5.1 Risultati delle prove di collaudo del sistema bicompartimentale e del circuito deossigenante 121
5.1.1 Verifica della compatibilità con il sistema di stimolazione 121
5.1.2 Risultati del collaudo del sistema di deossigenazione 123
5.2 Verifica funzionale del sistema bicompartimentale in esercizio con campioni di vena safena umana 128
5.3 Risultati della campagna sperimentale estensiva con campioni di vena safena umana 132
5.3.1 Mantenimento dell'integrità e delle strutture caratteristiche del campione 133
5.3.2 Analisi morfometriche 135

5.3.3 Proliferazione cellulare 141
6. Conclusioni e sviluppi futuri 147
APPENDICE A 154
Disegni tecnici 154
APPENDICE B 160
Principio di funzionamento del sensore di Clark 160
Problematiche riscontrate nell'utilizzo del sensore di Clark 161
APPENDICE C 163
Protocollo di assemblaggio della camera di coltura in ambiente sterile 163
APPENDICE D 166
Protocolli biologici 166
APPENDICE E 169
Referti delle analisi microbiologiche 169
APPENDICE F 173
Risultati delle misure di spessore 173
Bibliografia 177

Sommario

Introduzione

Le malattie cardiovascolari, ed in particolare le coronaropatie, rappresentano una delle cause maggiori di morte nei paesi occidentali. La tecnica chirurgica che prende il nome di bypass aorto-coronarico (CABG - Co*ronary Artery Bypass Grafting*), è finalizzata a ripristinare il corretto apporto di sangue al tessuto cardiaco a valle dell'occlusione mediante la realizzazione di un bypass: un tratto di vaso sano viene anastomizzato con la coronaria a valle del restringimento in modo da creare un ramo pervio, parallelo al vaso originario. La vena safena rappresenta il sostituto di elezione per i bypass aorto-coronarici grazie alla relativa facilità di asportazione, al decorso superficiale, alla elevata lunghezza del vaso che la rende utilizzabile in graft multipli, e al diametro paragonabile a quello delle arterie coronariche [1]. Tuttavia, la percentuale di ristenosi dei graft venosi a 10 anni dall'intervento è pari al 50%.

Infatti, in seguito alla trasposizione in ambiente arterioso, la vena passa da un sistema caratterizzato da basse pressioni (5-10 mmHg), basse portate non pulsatili e basso *shear stress* (0.1-0.6 Pa) ad un ambiente con pressioni (60-140 mmHg) e portate elevate e pulsatili (in media 200-250 ml/min) che comportano *shear stress* maggiore (1-7 Pa) [2]. L'adattamento del graft a queste condizioni e un grado limitato di iperplasia dell'intima (IH – *Intimal Hyperplasia*) sono considerati elementi importanti per il successo del graft. Tuttavia un adattamento anormale e incontrollato conduce ad un rimodellamento abnorme del vaso, a un'eccessiva IH con conseguente aumento dello spessore della parete e, in ultimo, al fallimento del graft e alle conseguenti complicazioni cliniche [1]. Il fallimento del graft venoso, definito anche *Vein Graft Disease* (VGD) è determinato da trombosi, IH e aterosclerosi che concorrono a determinare l'adattamento patologico del graft, rispettivamente, nel breve, medio e lungo termine (Figura 1).

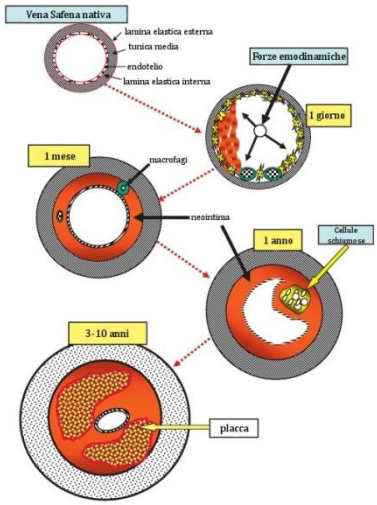


Figura 1 *Evoluzione temporale del VGD in cui si distinguono i tre processi caratteristici dell'adattamento patologico del graft: trombosi, IH e aterosclerosi.*

Negli ultimi anni sono stati sviluppati vari sistemi di coltura (*Ex Vivo Vessel Culture Systems* - EVCSs), finalizzati a simulare *ex-vivo* le condizioni in cui si trova la vena safena utilizzata come graft per bypass aorto-coronarici [3]. L'obiettivo è la comprensione degli effetti degli stimoli meccanici, a cui la

vena è soggetta in ambiente coronarico, sull'insorgenza del VGD e la valutazione *ex vivo* dell'efficacia di trattamenti farmacologici in grado di inibire la patologia.

Questo lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale del DEIB del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino. Lo scopo del lavoro è stato, inizialmente l'ottimizzazione della camera di coltura di un EVCS sviluppato precedentemente. In seguito, l'attività progettuale è stata dedicata alla realizzazione di un sistema di coltura bicompartimentale. L'obiettivo è stato l'ottenimento di una camera di coltura dotata di due compartimenti separati che consentano di condizionare in modo opportuno e differenziato l'ambiente intraluminale e quello extra-avventiziale del vaso. La camera bicompartimentale è stata inoltre progettata per essere interfacciabile con il sistema di stimolazione dell'EVCS preesistente e con un sistema di deossigenazione del medium di coltura, progettato *ad hoc*, volto a riprodurre le caratteristiche del tessuto parenchimale in termini di concentrazioni di ossigeno.

Materiali e metodi progettuali

Progettazione della camera di coltura ottimizzata

Sulla base di un'analisi critica del sistema di stimolazione e della camera di coltura preesistenti è stata ritenuta opportuna la riprogettazione della camera di coltura, al fine di ottimizzarla dal punto di vista del mantenimento della sterilità e dei tempi necessari alla realizzazione alle macchine utensili. La camera di coltura ottimizzata (Figura 2) è composta da un tappo, da un telaio portavaso e da una camera esterna (un tubo falcon da 50 ml, non mostrato in figura), che delimita l'ambiente di coltura e funge da riserva di medium. I principali elementi oggetto di riprogettazione sono stati gli elementi di connessione col circuito idraulico e il telaio portavaso. La connessione tra il circuito idraulico e l'interno della camera è realizzata per mezzo di cannule metalliche, inserite in appositi accessi realizzati sul tappo.

Figura 2 *Disegno CAD della nuova camera di coltura. In esso si distinguono il tappo, il telaio portavaso, le cannule metalliche d'accesso.*

Il telaio portavaso, composto di due sponde laterali e di un elemento di giunzione, dalla geometria molto semplice, consente l'alloggiamento di segmenti di vena safena di lunghezza massima pari a 7 cm, che vengono calzati su connettori in propilene,

appositamente presenti sul telaio, e fissati per mezzo di *vessel loop*. La presenza delle cannule metalliche consente di realizzare un'interfaccia rigida tra circuito e tappo, riducendo il rischio di infiltrazioni batteriche, e rende più resistente il telaio portavaso. La riserva è costituita da un tubo falcon da 50 ml, accoppiata al tappo mediante un O-ring in silicone.

La nuova camera di coltura realizzata soddisfa le specifiche delineate in fase di progettazione e supera le limitazioni riscontrate nell'utilizzo della camera precedente e, pertanto, il suo disegno è stato impiegato come punto di partenza per il progetto del sistema bicompartimentale.

Progettazione della camera bicompartimentale

In fase di progettazione è stata operata la scelta di mantenere l'utilizzo del tubo falcon da 50 ml come camera esterna e di introdurre al suo interno una seconda camera, realizzata a partire da una siringa da 20 ml modificata appositamente. In Figura 3 è riportato un disegno CAD del prototipo parzialmente assemblato, in cui si distinguono i vari elementi costitutivi.

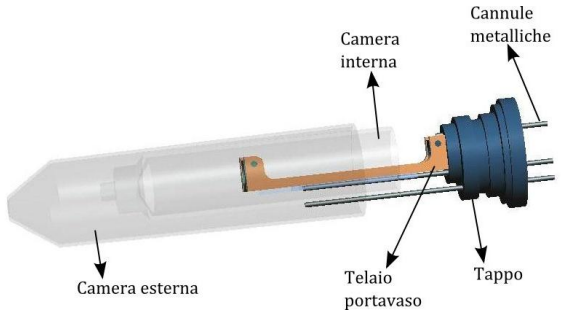


Figura 3 *Disegno CAD del prototipo parzialmente assemblato. In esso si distinguono il tappo, il telaio portavaso, le cannule metalliche d'accesso, la camera interna e la camera esterna.*

Rispetto alla versione precedente della camera di coltura è stata mantenuta la struttura del telaio portavaso, composta da due sponde laterali e da un elemento di giunzione, e l'utilizzo delle cannule metalliche come elemento di connessione del circuito idraulico. Per renderla compatibile con la presenza della camera interna, la lunghezza del telaio portavaso è stata ridotta, fino a poter calzare, con modalità analoghe a quelle della camera precedente, segmenti di vena di lunghezza massima pari a 5 cm. In questa versione della camera sono presenti due ambienti separati (Figura 4), che vanno a costituire i reservoir di due circuiti idraulici distinti; il medium presente nell'intercapedine tra la camera interna e la camera esterna alimenta il circuito di stimolazione e scorre all'interno del vaso, il medium presente nel compartimento extra-avventiziale è, invece, destinato ad essere deossigenato.

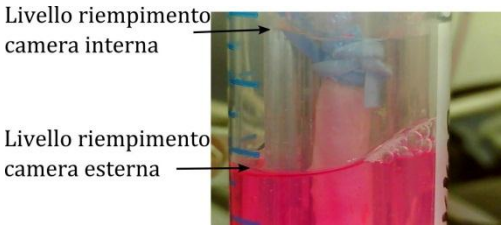


Figura 4 *Zoom sui livelli del medium nei due compartimenti della camera di coltura.*

Progettazione del circuito di deossigenazione

L'obiettivo del sistema di deossigenazione è quello di abbassare i livelli di concentrazione di ossigeno del medium nel compartimento extra-avventiziale al 5%. Il circuito di deossigenazione è costituito da una pompa Watson-Marlow 323Du (Watson

Marlow Group), con testa pompante 314D a quattro rulli (Watson Marlow), da un modulo deossigenante e dal circuito idraulico, realizzato mediante tubi in silicone Platinum Cured (Cole Parmer Instrument Company) di diametro interno e spessore della parete pari a 0.8 mm, biocompatibili e adatti a colture di tessuti, inseriti in tubi in PVC (Tygon® R-3603, Saint Gobain Performance Plastics) di diametro interno pari a 1.4 mm e spessore della parete pari a 0.8 mm, poco permeabili all'ossigeno. In Figura 5 è riportato uno schema del sistema di coltura bicompartimentale, in cui si può notare la presenza del sistema di deossigenazione e del sistema di stimolazione del vaso.

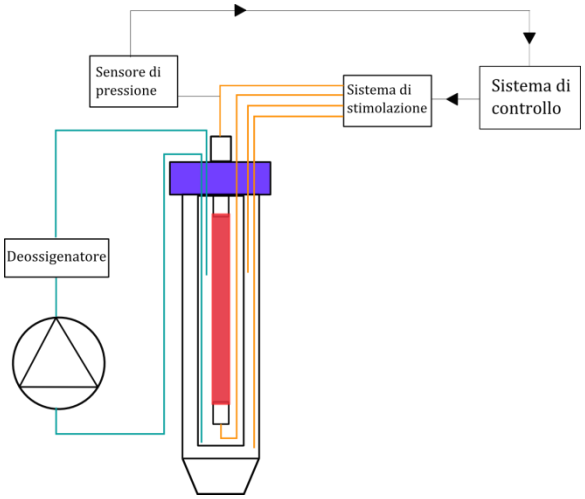


Figura 5 *Schema del sistema bicompartimentale; si distinguono la camera di coltura bicompartimentale, il sistema per la deossigenazione (in azzurro), il circuito di stimolazione (in arancione) e il sistema di controllo (in nero).*

Attraverso un'analisi basata su modelli matematici sono stati definiti i parametri caratteristici del sistema di deossigenazione, quali la lunghezza del tubo all'interno del modulo deossigenante, la portata di ricircolo e la concentrazione di O_2 imposta lato gas, con attenzione rivolta alle specifiche progettuali di ingombro ridotto, di limitazione delle perdite di carico e di ottenimento della concentrazione di ossigeno desiderata nel medium del comparto extra-avventiziale.

Il passo successivo è stato la realizzazione vera e propria del deossigenatore che, come si può osservare in Figura 6, risulta composto di tre elementi: un tappo, su cui sono presenti gli accessi necessari, un elemento per l'avvolgimento del tubo e un tubo falcon da 50 ml.

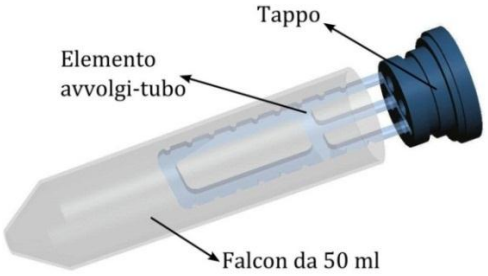


Figura 6 *Disegno CAD del deossigenatore parzialmente assemblato. Si distinguono il tappo, la struttura su cui avvolgere il tubo e la falcon utilizzata per contenere il volume di gas.*

In Figura 7 è riportata un'immagine del sistema di coltura assemblato, composto dalla camera di coltura bicompartimentale, dal sistema di stimolazione e dal sistema di deossigenazione.

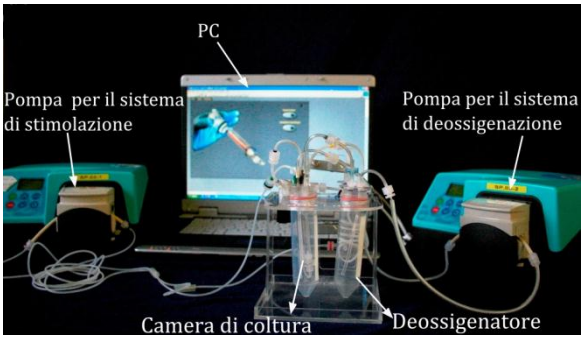


Figura 7 *Immagine del sistema di coltura bicompartimentale; si nota la pompa appartenente al sistema di stimolazione (a sinistra), il PC e la strutturata di supporto in cui sono collocati la camera di coltura ed il deossigenatore (al centro) e la pompa appartenente al sistema di deossigenazione (a destra).*

Materiali e metodi sperimentali

Verifica della compatibilità con il sistema di stimolazione

Al fine di valutare la compatibilità con il sistema di stimolazione, la camera bicompartimentale è stata connessa al circuito di stimolazione e a quello di deossigenazione ed entrambi i sistemi sono stati posti in esercizio per 48 h.

Collaudo del sistema di deossigenazione

Per la validazione delle scelte progettuali fatte sulla base dei modelli matematici sono state condotte due serie di esperimenti di caratterizzazione del comportamento del deossigenatore. Una prima serie di prove è stata effettuata con l'obiettivo di verificare il comportamento del deossigenatore in assenza di ricircolo per validarne il dimensionamento. Sono state valutate le tempistiche di risposta (τ) e il valore di O_2% in uscita dal deossigenatore per portate variabili pari a 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 8 ml/min. La seconda serie di prove è stata realizzata per valutare il comportamento del sistema di deossigenazione nel transitorio, fino al raggiungimento del valore di regime, replicando le condizioni reali di esercizio del deossigenatore. È stato valutato, quindi, l'andamento del valore di O_2% in un volume di fluido di lavoro pari al volume di riempimento del compartimento extra-avventiziale, per una portata di ricircolo fissata a 5 ml/min. Le misurazioni sono state effettuate utilizzando il sensore di Clark (DO-166FTL-AC, Lazar Research Laboratories Inc., Los Angeles, USA), disponibile presso il µBSLab.

Messa in esercizio con campioni di vena safena umana

Impiegando segmenti di vena safena umana, ottenuti da pazienti sottoposti a CABG, sono stati condotti due esperimenti per la verifica funzionale del sistema in esercizio. In particolare, in una prima prova la vena è stata perfusa in condizioni venose (*venous perfusion* - VP), mentre nella seconda la vena stata stimolata in condizioni CABG-like. In entrambe le prove sono state imposte le medesime condizioni di ricircolo del medium nella camera interna e la durata della coltura è stata di 7 giorni. In Figura 8 è mostrata un'immagine del sistema di coltura assemblato sotto cappa a flusso laminare.

Durante le prove, sono state prelevate e sottoposte ad analisi microbiologiche aliquote di medium di coltura a tempi diversi per verificare il mantenimento della sterilità.

Figura 8 *Sistema di coltura assemblato sotto cappa; a sinistra si distingue il deossigenatore connesso con la camera di coltura posizionata a destra.*

Campagna sperimentale con campioni di vena safena umana

Parallelamente all'attività di progettazione del sistema bicompartimentale e del circuito di deossigenazione è stata condotta una campagna sperimentale presso il Centro Cardiologico Monzino volta allo studio del rimodellamento di segmenti di vena safena umana sottoposti a condizioni fluidodinamiche arteriose. A tal fine sono stati impiegati il sistema di stimolazione preesistente e la camera di coltura monocompartimentale ottimizzata (Figura 9).

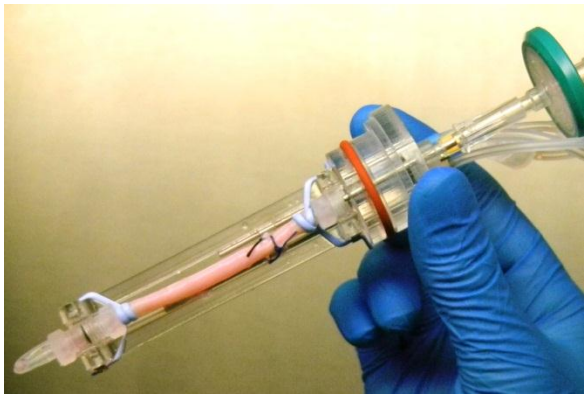


Figura 9 *Fase del montaggio della vena safena all'interno della camera di coltura. La vena è stata calzata sugli appositi connettori ed è stata afferrata mediante vessel loop.*

Gli esperimenti sono stati condotti su una numerosità di campioni pari a 6 sottoposti a stimolazione CABG-like e 6 sottoposti a perfusione venosa; entrambi i gruppi di esperimenti hanno avuto durata pari a 7 giorni. Al termine della coltura, dai campioni sono state ottenute sezioni di spessore pari a 5 µm che sono state sottoposte a colorazioni H/E e a immunofluorescenza (vWF/DAPI, α-SMA/DAPI) per le analisi morfologiche, a colorazione tricromica di Masson, per le analisi morfometriche di misura dello spessore della parete, del perimetro e dell'area del lume del vaso, e ad analisi immunoistochimiche con colorazione per Ki67 per valutare la proliferazione cellulare.

Risultati

Dalla prova di collaudo su banco è emersa la compatibilità tra la camera di coltura bicompartimentale, il sistema di deossigenazione ed il sistema di stimolazione. La forma d'onda pressoria ottenuta corrisponde a quella desiderata nel range 80-120 mmHg.

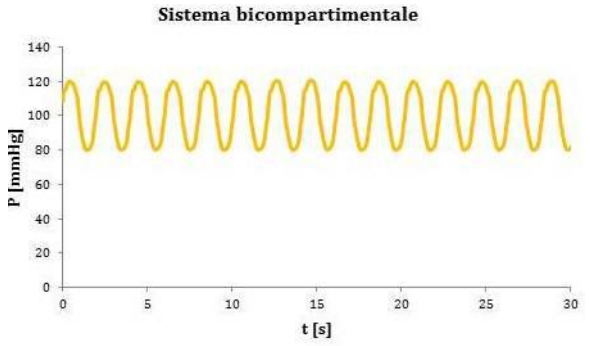


Figura 10 *Andamento della forma d'onda pressoria pulsatile nel range 80-120 mmHg.*

Per quanto riguarda il collaudo del modulo deossigenante, la prima serie di prove ha mostrato, come previsto, una diminuzione del $\Delta O_2\%$, tra uscita e ingresso del deossigenatore, all'aumentare della portata. In Figura 11 si può osservare l'andamento dello scambio specifico ($\Delta O_2\%$) sperimentale confrontato con quello teorico; si nota che le due curve hanno andamenti coerenti al variare della portata imposta, ad indicare che la

portata influenza in modo analogo il comportamento teorico e quello reale del modulo deossigenante.

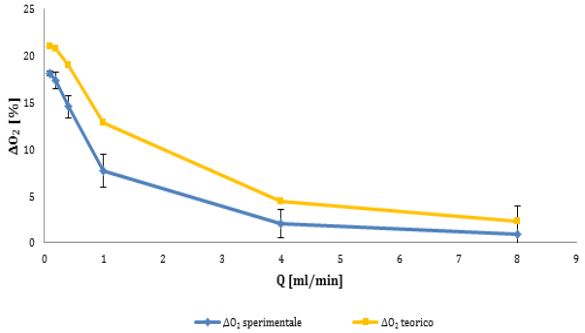


Figura 11 *Valori percentuali di ΔO_2 sperimentale (in azzurro) e teorico (in arancio) per diversi valori di portata.*

Le seconda serie di prove ha mostrato un forte discostamento del dato reale dal modello; in particolare si è osservato che il sistema non raggiunge a regime il valore di concentrazione di O_2 imposto a lato gas e che le tempistiche di raggiungimento di un valore di equilibrio sono significativamente maggiori rispetto a quanto indicato dal modello (Figura 12). Una possibile spiegazione di questi risultati potrebbe essere identificabile nei fenomeni, quali la diffusione dal pelo libero, attraverso la parete del sostituto del vaso impiegato nelle prove (tubo in silicone) e attraverso gli altri elementi del circuito, non totalmente impermeabili all'O_2, che potrebbero contrastare, in modo più significativo di quanto previsto nel modello, il raggiungimento della concentrazione di O_2 desiderata. Una seconda possibile spiegazione dei risultati ottenuti potrebbe essere legata allo strumento che è stato utilizzato che, per tutti i valori di Q applicati, sembra mostrare una perdita della calibrazione.

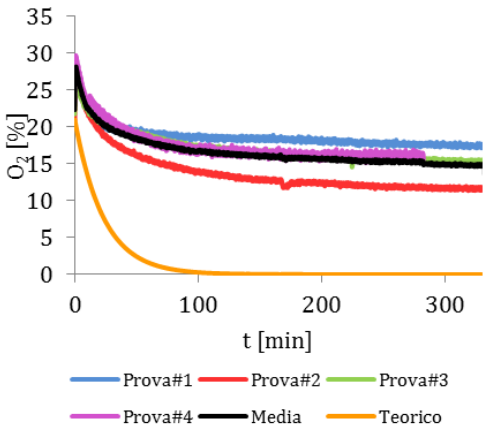


Figura 12 *Tracciato della concentrazione di O_2 durante le prove con ricircolo (Prova1-4), media dei tracciati sperimentali (Media) e andamento teorico.*

La mancata disponibilità di uno strumento di misura alternativo a quello in dotazione non ha reso però possibile verificare quale, tra le ipotesi fatte, sia corretta o abbia l'effetto preponderante. Senza dubbio, le non idealità del sistema influiscono sul valore di O_2% raggiunto durante il transitorio, tuttavia, le problematiche riscontrate nell'utilizzo del sensore ci spingono a tenere in considerazione la possibilità che l'elevata discrepanza tra i dati sperimentali e quelli estratti dal modello teorico sia legata principalmente allo strumento di misura impiegato e non alle assunzioni introdotte nel modello di dimensionamento.

La verifica funzionale del sistema bicompartimentale, in condizioni di esercizio con segmenti di vena safena umana, non ha mostrato evidenti variazioni dei livelli del medium nei due compartimenti durante la prova in condizioni VP. Per quanto riguarda la prova di stimolazione CABG-like si è osservato, a partire dal terzo giorno di coltura l'aumento del volume di medium nel compartimento extra-avventiziale a causa di

fenomeni di perfusione interstiziale attraverso la parete del vaso. Una stima quantitativa del fenomeno spinge a ritenerlo trascurabile, rispetto al valore della portata di ricircolo imposto nel sistema di deossigenazione, tuttavia, questo dato andrebbe verificato e quantificato più rigorosamente con ulteriori prove.

Risultati della campagna sperimentale con campioni di vena safena umana

Dall'osservazione dei preparati istologici (colorazione con H/E) (Figura 13-a) e delle immunofluorescenze (α-SMA/DAPI e vWF/DAPI) (Figura 13-b) si può notare l'integrità della parete vascolare e dello strato endoteliale, l'allineamento delle SMC in direzione circonferenziale e una normale distribuzione dell'ECM nelle diverse condizioni sperimentali. Questi risultati confermano il mantenimento delle strutture del campione biologico nell'EVCS, fino a 7 giorni di coltura.

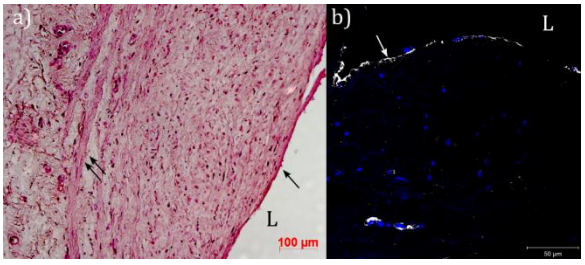


Figura 13 *a: colorazione H/E su campione stimolato CABG-like, si distingue l'integrità dello strato endoteliale (feccia singola), una distribuzione uniforme dei nuclei cellulari e l'allineamento circonferenziale delle fibre muscolari (freccia doppia). b: Immunofluorescenza vWF(in bianco)/DAPI(in blu) su campione stimolato CABG-like, si distingue l'integrità dello strato endoteliale (freccia singola) e una distribuzione uniforme dei nuclei cellulari (in blu).*

Le analisi morfometriche di misura dello spessore, eseguite su sezioni colorate con tricromica di Masson (Figura 14), hanno mostrato che la stimolazione CABG-like comporti una riduzione statisticamente significativa dello spessore della parete del vaso, pari al 43% (Figura 15). Nei campioni perfusi invece, si è osservata una diminuzione non significativa dello spessore del vaso rispetto al controllo, pari circa al 6% (Figura 15).

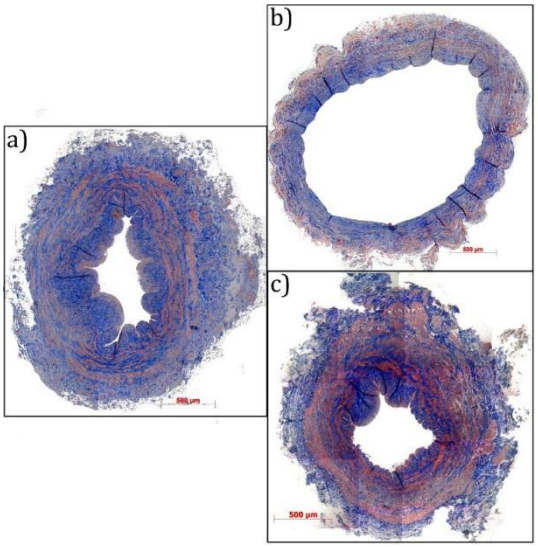


Figura 14 *Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 10X di sezioni di segmenti di vena safena umana nativa (a), stimolata CABG-like (b) e perfusa (c), sottoposte a colorazione tricromica di Masson.*

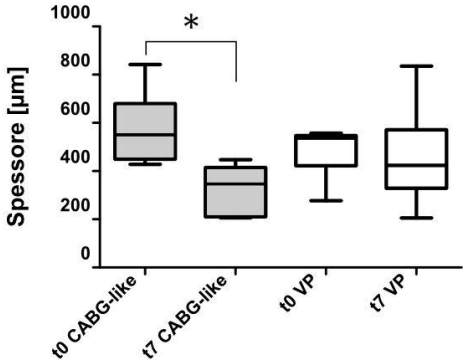


Figura 15 *Risultati delle misure dello spessore su campioni stimolati CABG-like (t7 CABG-like) e perfusi VP (t7 VP), confrontati con i rispettivi controlli a tempo 0 (t0 CABG-like e t0 VP), il t-test ha mostrato la differenza significativa tra il gruppo t7 CABG-like e il rispettivo gruppo di campioni nativi (* = P < 0.05).*

La valutazione del perimetro e area luminali ha portato a risultati coerenti con le osservazioni riguardanti lo spessore della parete dei campioni. Nei vasi sottoposti a CABG è stato osservato un aumento del perimetro, in media pari a 4.45 ± 2.22 mm, e dell'area luminale, in media pari a circa 7.9 ± 3.84 mm^2. Per quanto riguarda i campioni perfusi, invece, non si sono osservati cambiamenti altrettanto evidenti con una riduzione del perimetro pari a 0.41 ± 0.61 mm e dell'area pari a 0.34 ± 0.5 mm^2.

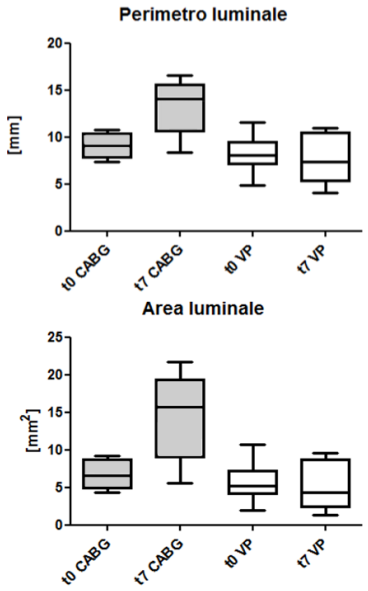


Figura 16 *Risultati delle misure di perimetro e area luminale dei campioni sottoposti a stimolazione CABG-like (t7 CABG) e a perfusione (t7 VP) confrontati con i campioni nativi (t0 CABG e t0 VP).*

Da questi risultati emerge che la perfusione in condizioni venose non comporta evidenti alterazioni morfologiche a carico della parete del vaso; viceversa si è osservato che pattern pressori arteriosi comportano la riduzione dello spessore della tunica media e un aumento del lume del vaso. Questi risultati, che trovano conferma in lavori di letteratura [4, 5], potrebbero essere correlati a fenomeni proliferativi a carico delle SMC ed alla riorganizzazione della parete vascolare connessa a questi fenomeni.

Analisi immunoistochimiche volte all'identificazione del marcatore di proliferazione cellulare Ki67 hanno mostrato, (Figura 17), che la stimolazione CABG-like induce un aumento significativo, pari al 62.8%, del rapporto tra il numero di cellule che esprimono Ki67 ed il numero di cellule totali. Viceversa, nei campioni perfusi questo rapporto subisce un aumento, non significativo del 12% circa.

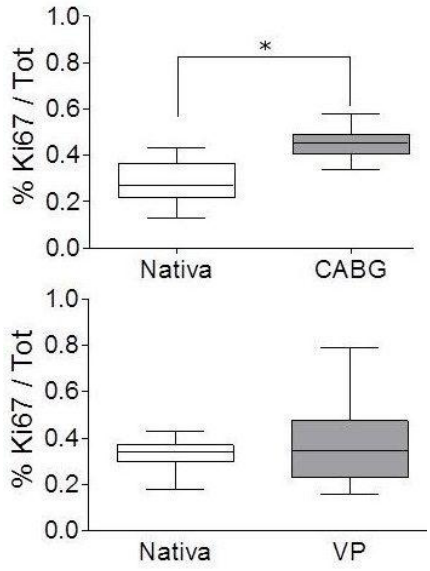


Figura 17 *Risultati del confronto del rapporto cellule marcate con Ki67 / cellule totali tra i campioni stimolati e i campioni nativi (sopra) e tra i campioni perfusi e i campioni nativi (sotto).*

Questo risultato indica la presenza di fenomeni proliferativi all'interno della parete dei vasi conseguentemente all'applicazione di pattern di stimolazione arteriosi simili a quelli sperimentati dalla vena nel CABG. Questi fenomeni, di cui si trova conferma in letteratura [5, 6], sono probabilmente

responsabili delle modificazioni morfologiche osservate nella parete dei vasi stimolati.

L'osservazione dei preparati istologici ha portato, inoltre, all'individuazione di un rimodellamento morfologico anche a livello dei *vasa vasorum* (Figura 18), che nei campioni sottoposti a stimolazione CABG-like presentano dimensioni maggiori del lume e dello spessore della parete. Viceversa, in seguito a perfusione venosa l'aspetto dei *vasa vasorum* si mostra pressoché inalterato rispetto al campione nativo. Una possibile spiegazione del fenomeno potrebbe risiedere nell'adattamento dei *vasa vasorum* alle modificazioni morfologiche a cui la vena va incontro in seguito alla stimolazione in condizione di regime pressorio arterioso.

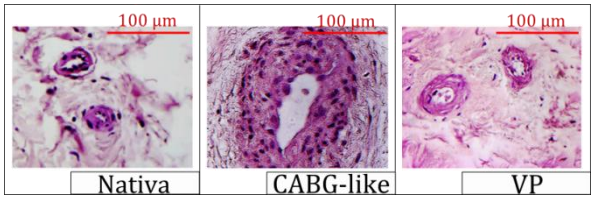


Figura 18 *Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 40X su colorazioni H/E in cui si notano le modificazioni morfologiche e l'aumento di cellularità dei vasa vasorum in condizioni CABG-like rispetto al vaso nativo: in condizioni VP non si osserva questo tipo di alterazioni.*

Allo stato attuale, presso in LIT del Centro Cardiologico Monzino, sono in corso ulteriori analisi volte a chiarire le origini e le implicazioni di questo fenomeno.

Discussione

L'attività di progettazione ha portato alla realizzazione di un sistema di coltura bicompartimentale, che si è dimostrato un promettente strumento per lo studio dei fenomeni coinvolti nell'insorgenza del *vein graft disease* della vena safena utilizzata come bypass aorto-coronarico. Questo sistema ha consentito, infatti di mantenere in vita il segmento di vena safena per almeno 7 giorni, di garantire un ambiente privo di contaminazione e di realizzare una compartimentazione dell'interno e dell'esterno del vaso. Grazie all'integrazione con il sistema di deossigenazione sarà possibile ricreare in coltura le differenti condizioni ematochimiche caratteristiche dell'ambiente intraluminale ed extra-avventiziale. Inoltre, il sistema bicompartimentale potrà essere impiegato in campagne sperimentali che prevedano un diverso condizionamento biochimico dei due compartimenti o in cui si voglia osservare l'*homing* di popolazioni cellulari nel versante luminale della vena safena. Infine, mediante l'integrazione con il sistema di stimolazione preesistente, il sistema consente di sottoporre i campioni biologici a condizioni pressorie tipiche dell'ambiente arterioso in modo controllato, standardizzato e riproducibile.

L'analisi dei risultati della campagna sperimentale estensiva ha mostrato l'esistenza di marcati fenomeni di rimodellamento a carico delle strutture della parete vascolare in seguito alla stimolazione in condizioni CABG-like. Le analisi morfometriche hanno mostrato, infatti, in queste condizioni, una riduzione significativa dello spessore della parete e, coerentemente, l'aumento del perimetro e dell'area luminale. Le analisi immunoistochimiche con Ki67 hanno

mostrato la presenza di un'intensa attività proliferativa in corrispondenza del rimodellamento vascolare, suggerendo che alla base delle modificazioni morfologiche possano esserci fenomeni proliferativi a carico delle SMC.

Bibliografia

1. Muto, A., et al., *Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies.* Circ J, 2010. **74**(8): p. 1501-12.
2. Dummler, S., et al., *Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression.* BioMedical Engineering OnLine, 2011. **10**(1): p. 62.
3. Piola, M., et al., *Tools and procedures for ex vivo vein arterialization, preconditioning and tissue engineering: a step forward to translation to combat the consequences of vascular graft remodeling.* Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2012. **7**(3): p. 186-95.
4. Saucy, F., et al., *Ex vivo Pulsatile Perfusion of Human Saphenous Veins Induces Intimal Hyperplasia and Increased Levels of the Plasminogen Activator Inhibitor 1.* European Surgical Research, 2010. **45**(1): p. 50-59.
5. Voisard, R., et al., *Pulsed perfusion in a venous human organ culture model with a Windkessel function (pulsed perfusion venous HOC-model).* Med Sci Monit, 2010. **16**(11): p. CR523-9.
6. Berard, X., et al., *Role of hemodynamic forces in the ex vivo arterialization of human saphenous veins.* J Vasc Surg, 2013.

Abstract

Introduction

Cardiovascular (CVDs) and coronary artery diseases (CADs) are the major cause of death in western countries. Coronary Artery Bypass Grafting (CABG) is a standard procedure for the revascularization of the ischemic myocardium; during CABG, one or more stenotic coronary arteries are bypassed using a graft in order to restore the physiological blood supply to the hearth. Saphenous vein (SV) represents the gold standard in CABG surgery, owing to its superficial anatomical position, its length and its diameter, similar to that of coronary arteries [1]. However, the SV long term patency decrease over time (50% restenosis after 10 years) due to a pathological remodeling caused by the new biomechanical environment.

In fact, while in physiological venous conditions SVs are exposed to low pressure conditions (5-10 mmHg), *quasi*-steady flow patterns and low shear stress (0.1-0.6 Pa), after grafting, the SV is subjected to higher pressure loads (60-140 mmHg), pulsatile high flows (mean value of 200-250 ml/min) and higher shear stresses (1-7 Pa) [2]. An abnormal and uncontrolled adaptation of the vessel leads to an excessive degree of remodeling and an excessive IH, resulting in increased wall thickness and, at last, graft failure, namely Vein Graft Disease (VGD) [1]. VGD is determined by thrombosis, atherosclerosis and IH, which combine to determine the pathological adaptation of the graft in the short, medium and long term, respectively (Figure 1).

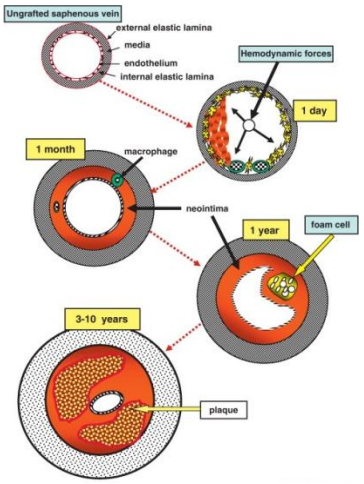


Figure 1 *VGD time evolution.*

Recently, several *ex vivo* vessel culture systems have been devised in order to mimick the altered biofluidodynamic conditions experienced by the SV after CABG. Their main goals are the investigation of the effects of mechanical stimuli on vein graft in a coronary environment and the *ex vivo* evaluation of pharmacological treatments efficacy in inhibiting VGD development.

This thesis focused first onto the redesign of the culture chamber of a preexisting EVCS. Then activity was focused on the design of a double-compartment *ex vivo* vessel culture system. The specific aim of this work was the design of a compartmented culture chamber that could be interfaced with an existing stimulation system and a

deoxygenation system designed to reproduce oxygen partial pressures typical of the parenchymal tissue.

Technical materials e methods

Optimized culture chamber design

The first step of the design process consisted in the analysis of qualities and critical points of the pre-existing stimulation system and culture chamber. As a result of this analysis, it was deemed advisable to redesign the culture chamber in order to optimize it in terms of sterility keeping, ease of production, and reduction of machine time. The culture chamber (Figure 2) includes a SV housing and a medium reservoir. Metallic cannulas allow the connection between the hydraulic circuit and the interior of the chamber.

Figure 2 *CAD model of the optimized culture chamber.*

The vessel housing, consisting of two side elements and a junction element in between, allows to host SV segments up to 7-cm-lenght, cannulated on both ends with polypropylene fittings and fixed on them using vessel loops. A 50 ml falcon tube acts as a reservoir and contains the vessel housing. A silicone O-ring connects the reservoir to the vessel housing.

This new culture chamber meets the specifications outlined in the design phase and overcomes the limitations of the previous version. Its design has since been used as a starting point for the design of the double-compartment system.

Double-compartment vessel chamber design

In this design a 50 ml falcon tube was kept as the outer chamber and an inner chamber, made from a modified 20 ml syringe, was introduced as second reservoir (Figure 3).

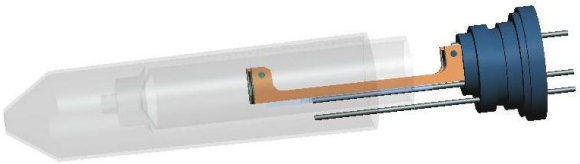


Figure 3 *CAD model of the double-compartment culture chamber.*

Compared with the previous version of the culture chamber, the structure of the vessel housing and the use of metallic cannulas as connecting element for the hydraulic circuit are maintained. The length of the housing has been reduced to host SV segments up to 5 cm long. This version of the vessel chamber is also characterized by two distinct hydraulic circuits, fed by two different reservoirs (Figure 4). The culture medium contained in the inner reservoir constitutes the extra-adventitial mileu and feed the deoxygenation system; the outer reservoir feed the stimulation circuit.

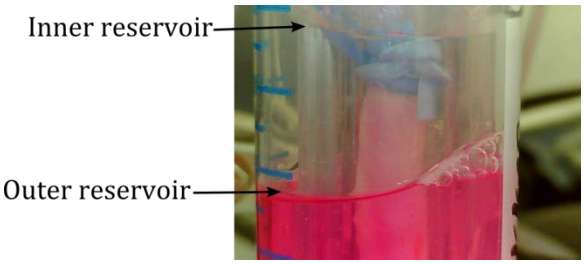


Figure 4 *Reservoirs' medium levels.*

Deoxygenation circuit design

The aim of the deoxygenation circuit is to lower the extra-adventitial compartment oxygen concentration to 5%. The circuit consists of a Watson-Marlow peristaltic pump (323 Du, Watson Marlow Group), with 314D pumping head (Watson Marlow Group), a deoxygenation component and a low O_2 permeable hydraulic circuit. Figure 5 shows a schematic of the deoxygenation circuit, in which the stimulation system is also shown.

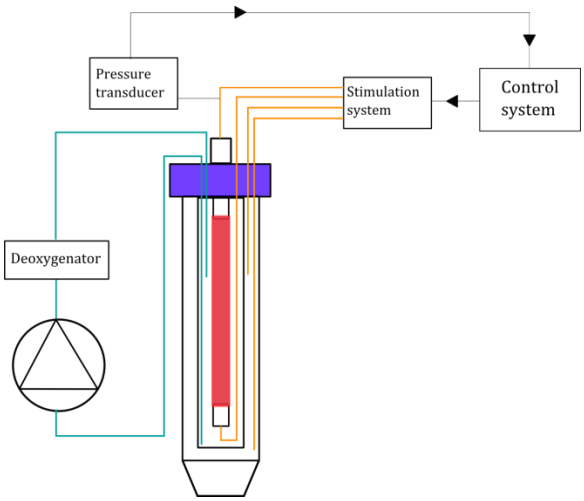


Figure 5 *Schematic representation of the architecture of the ex vivo vessel culture system.*

System parameters like tubing length, flow rates, and gaseous O_2 partial pressure have been defined through mathematical modeling. In the design phase particular attention was dedicated to the size reduction, the limitation of pressure drops, and the obtainment of the desired O_2 concentration in the medium. The deoxygenator, as show in Figure 6, was built using a 50 ml falcon tube as a container.

Figure 6 *CAD model of the deoxygenation component.*

In Figure 7, the final layout of the system is shown. Main components like the double-compartment vessel chamber, the stimulation system, and the deoxygenation system are depicted.

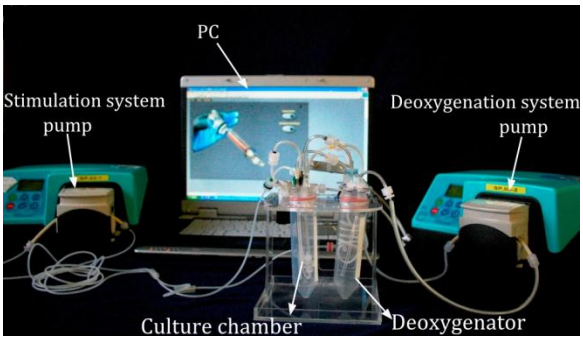


Figure 7 *Final layout of the ex vivo vessel culture system.*

Experimental materials e methods

Systems compatibility test

In order to assess its compatibility with the stimulation system, the double-compartment chamber has been subjected to 48 h test runs while connected to both circuits.

Deoxygenation test

Two sets of experiments have been carried out to characterize the deoxygenation element and asses the validity of the design choices. The objective of the first set of tests was the validation of the deoxygenator dimensioning. The task was carried out by verifying its behavior in absence of medium recirculation. Tests were run with variable flow rates, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 8 ml/min, while response times and O_2 concentration drops were recorded. The second class of test was conducted to evaluate the behavior in the transient, until steady state was reached, replicating the real deoxygenator operating conditions. In this test the drop in O_2 concentration in a defined volume of medium subjected to a 5 ml/min flow rate was recorded. Measurements were made using a Clark electrode (DO-166FTL-AC, Lazar Research Laboratories Inc., Los Angeles, USA), available at µBSLab.

Use with human saphenous vein

Surplus segments of human SV were obtained from patients undergoing CABG and were used in functional test of the operating system. In the first test the vein was perfused in venous conditions (VP). In the second, the vein was subjected to CABG-like stimulation. In both tests the extra-adventitial medium was recirculated at the same flow rate of 5 ml/min. Test were performed for a period of 7 days. Figure 8 shows the culture chamber assembled under laminar flow hood. During the tests some medium aliquots were collected for microbiological analysis in order for its "sterility-keeping" ability to be assessed.

Figure 8 *Double-compartment culture chamber (on the right) and deoxygenator (on the left) assembled under laminar flow hood.*

Experimental campaign with human SV segments

During the double-compartment chamber and deoxygenation system design a set of experiments was performed to investigate the remodeling of segments of human saphenous vein under arterial flow conditions. The experiments were performed adopting the pre-existing stimulation system and the optimized mono-compartment culture chamber (Figure 9) on a total of 12 samples.

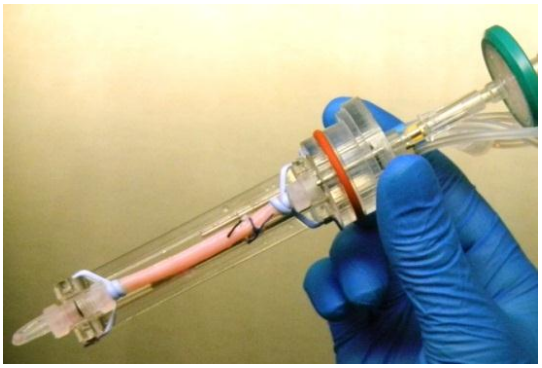


Figure 9 *SV sample fixed on the polypropylene connectors using the vessel loop.*

6 samples were tested under CABG-like conditions while the rest was subjected to venous perfusion, both class of test were performed for a period of 7 days. After culture, 5 µm-thick sections were obtained from each sample. Sections underwent H/E staining and immunofluorescence analysis (vWF/DAPI, α-SMA/DAPI) to evaluate vein wall's structure integrity, Masson's trichrome staining for wall thickness analysis and Ki67 immunohistochemical analysis to assess cell proliferation.

Results

The compatibility between the double-compartment culture chamber, the deoxygenating system, and the stimulating system was proven by the bench tests. The desired pressure, ranging from 80-120 mmHg, was easily obtained (Figure 10).

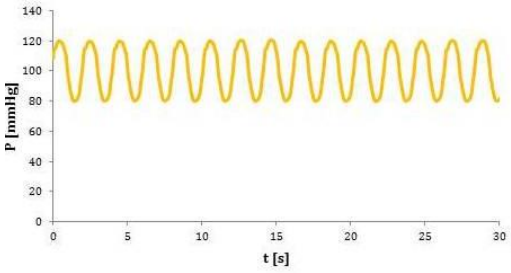


Figure 10 *Pressure waveform obtained during bench tests with the double-compartment system.*

In the first set of experiments, the deoxygenating system showed an adequate performance by reliably and predictably reducing the oxygen concentration of the system in a range of flow conditions. Figure 11 shows the comparison of theoretical and measured changes in oxygen concentration under various flow conditions. Predicted and measured values have consistent trends, thus showing that flow rate exerts the same influence on both theoretical and experimental deoxygenator behavior.

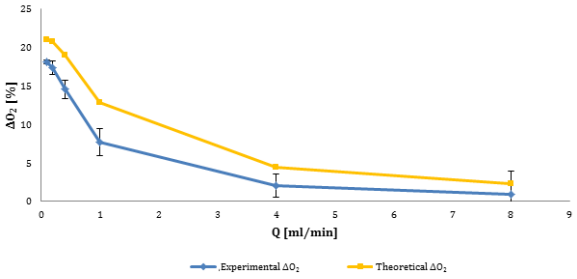


Figure 11 *Theoretical (orange line) and measured (blue line) change in oxygen partial pressure comparison under various flow conditions.*

In the second set of experiments, the discrepancies between predicted and measured oxygen pressures increased significantly. Moreover, the time required to reach equilibrium deviated significantly from the model predictions (Figure 12).

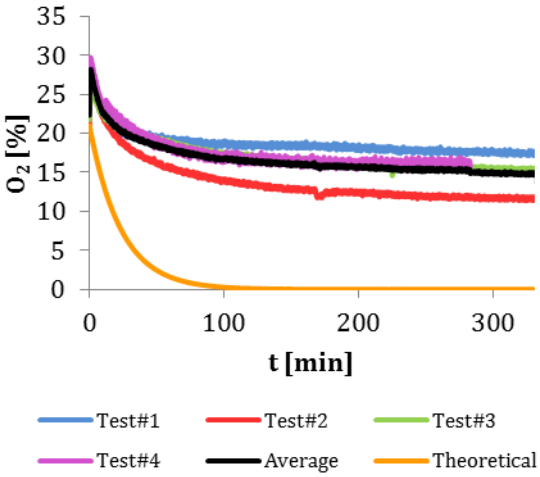


Figure 12 *Oxygen partial pressure drop during the second set of experiments, compared to their average a to the model.*

A possible explanation of these results is the presence of an oxygen diffusion greater than foreseen in the model, which can prevent

desired O_2 concentration achievement. A second possible explanation could be found in the tendency of the measurement system to deviate from calibration under every flow condition tested. The true cause of the discrepancies between model and experimental results could not be eventually individuated due to the impossibility to test with a different instrument. While the permeability issues can have a significant influence on the measured O_2 concentration, the non-ideal behavior of the sensor and the resulting measurement errors do not allow us to completely discard the proposed model.

During the test under VP conditions the double-compartment system did not show significant changes in the medium levels. In the CABG-like stimulation test on the other hand, an increase of the medium volume in the extra-adventitial compartment was observed from the third day of culture. The observed increase is due to the interstitial perfusion that takes place in the vessel wall. A quantitative evaluation of this phenomenon confirmed its negligibility if compared to the higher recirculation flows generated by the de-oxygenation device. Further tests are required to a complete quantification of the phenomenon.

Experimental campaign with human SV segments results

Observation of histological sections (H/E staining), (Figure 13-a), and immunofluorescence analysis (α-SMA/DAPI e vWF/DAPI), (Figure 13-b), confirmed the integrity of both vascular wall and endothelial layer. SMC circumferential alignment and a normal ECM distribution were observed, confirming the preservation of the biological sample kept in the EVCS culture for a total of 7 days. These results confirm biological sample structures retention up to 7 days of culture.

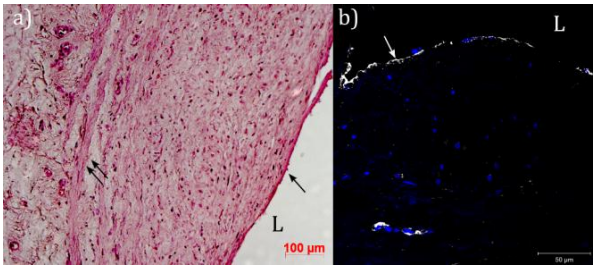


Figure 13 *H/E staining (a) and immunofluorescence images (b) of samples after CABG-like stimulation. Single arrows indicate intact endothelial layer.*

Morphometric analysis of the thickness, performed on sections stained with Masson's trichrome (Figure 14) showed that a statistically significant reduction of the wall thickness (43%) is produced by CABG-like stimulation (Figure 15).

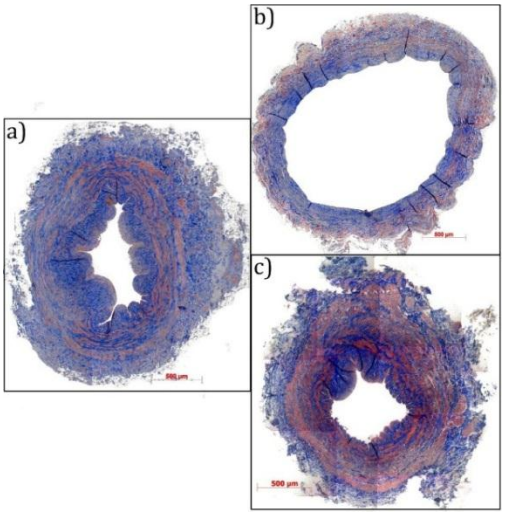


Figure 14 *Masson's trichrome staining on control sample (a), CABG-like stimulated sample (b) and venous perfused sample (c).*

In the perfused samples on the other hand, the decrease in wall thickness compared to the control was estimated to be only 6% (Figure 15), a value of no statistical significance.

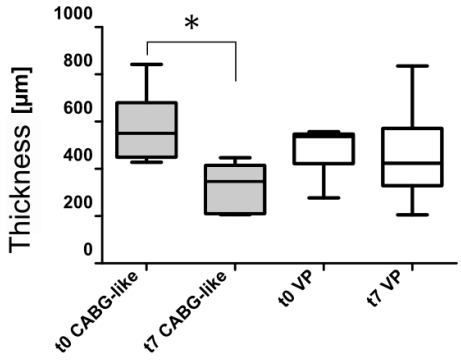


Figure 15 *Thickness comparison between control samples and CABG-like stimulated samples and control samples and VP samples (* = P<0.05).*

Luminal perimeter and area evaluation showed consistent results with sample wall thickness analysis (Figure 16). CABG-stimulated vessels showed an increase in perimeter of 4.45 ± 2.22 mm on average and in area value of 7.9 ± 3.84 mm^2. In venous perfused vessels little changes were observed (perimeter: + 0.41 ± 0.61 mm, area: + 0.34 ± 0.5 mm^2).

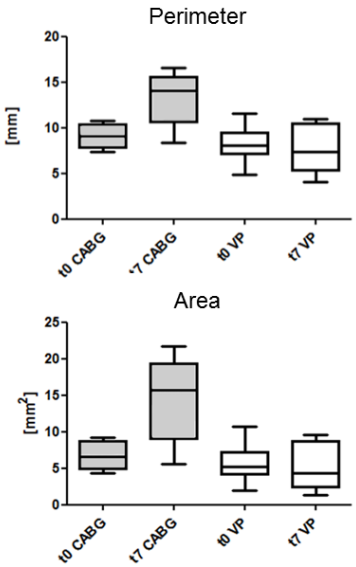


Figure 16 *Perimeter and area measurement results.*

These results show that perfusion under venous conditions doesn't result in conspicuous vein wall morphological alterations; by contrast arterial pressure patterns involve medial layer thickness reduction and vessel lumen increase. These results, confirmed in literature [4, 5], could indicate that SMC proliferative phenomena imply vascular wall rearrangement.

Immunoistochemical analysis, through the identification of the marker for cellular proliferation, Ki67, shows that CABG-like stimulation induces a significant increase in the Ki67 positive cells – total cells ratio (Figure 17). In the perfused samples on the other hand, no significant change in the ratio was observed (Figure 17).

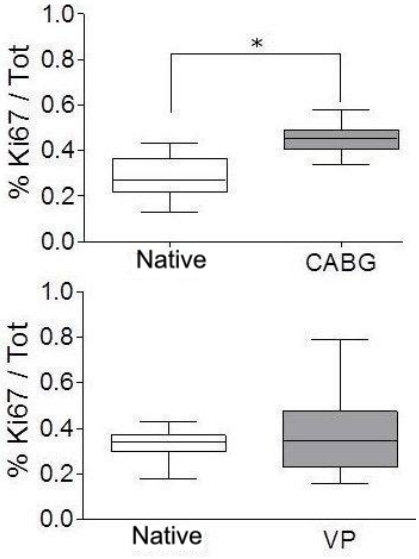


Figure 17 *Ki67 positive cells – total cells ratio comparison between control samples and CABG-like stimulated samples and control samples and VP samples.*

Results demonstrate how the application of arterial stimulation patterns, similar to the one experienced by the vein in the CABG, are able to induce intense proliferation

phenomena in the vessel wall. These phenomena, confirmed elsewhere in literature [5, 6], are probably responsible for the morphologic changes that can be observed in the wall of the stimulated vessels.

Histological samples observation also led to identify vasa vasorum morphological remodeling after CABG-like stimulation. As shown in Figure 18, their lumen appears to be enlarged and their wall thickened. No changes were observed after venous perfusion.

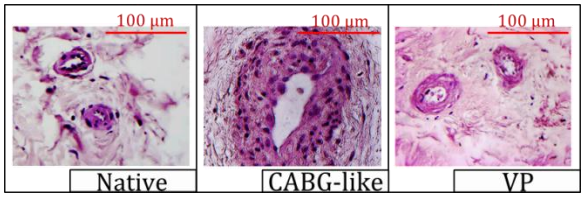


Figure 18 *H/E staining of vasa vasorum of native samples, CABG-like stimulated samples and VP samples.*

Discussion

The design activity has led to a double-compartment culture system, which has proved to be a valuable tool for the study of the phenomena involved in the establishment of VGD of the saphenous vein used as a coronary bypass. This system allowed to cultivate saphenous vein segments up to 7 days, ensuring a contamination-free environment and achieving a partition of the inside from the outside of the vessel. Through integration with the deoxygenation system the different luminal and extra-adventitial hematochemical conditions could be reproduced. In addition the double-compartment system could be used for application of cell seeding in the lumen and study of the effects of differential chemical conditioning. Plus, thanks to integration with stimulation system it allows to reproduce arterial pressure patterns.

Experimental campaign with human SV results have shown evident remodeling of vein wall structures and increase in cellular proliferation after subjection to arterial-like conditions.

References

1. Muto, A., et al., *Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies.* Circ J, 2010. **74**(8): p. 1501-12.
2. Dummler, S., et al., *Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression.* BioMedical Engineering OnLine, 2011. **10**(1): p. 62.
3. Piola, M., et al., *Tools and procedures for ex vivo vein arterialization, preconditioning and tissue engineering: a step forward to translation to combat the consequences of vascular graft remodeling.* Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2012. **7**(3): p. 186-95.
4. Saucy, F., et al., *Ex vivo Pulsatile Perfusion of Human Saphenous Veins Induces Intimal Hyperplasia and Increased Levels of the Plasminogen Activator Inhibitor 1.* European Surgical Research, 2010. **45**(1): p. 50-59.
5. Voisard, R., et al., *Pulsed perfusion in a venous human organ culture model with a Windkessel function (pulsed perfusion venous HOC-model).* Med Sci Monit, 2010. **16**(11): p. CR523-9.
6. Berard, X., et al., *Role of hemodynamic forces in the ex vivo arterialization of human saphenous veins.* J Vasc Surg, 2013.

Introduzione

Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (μBSLab) del DEIB (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino. Obiettivo finale del progetto è quello di ricreare *ex vivo* i pattern di stimolazione arteriosa a cui è sottoposta la vena safena nelle applicazioni di bypass aorto-coronarico (*Coronary Artery Bypass Grafting* – CABG), al fine di comprendere i meccanismi cellulari alla base del fenomeno di arterializzazione della vena safena, o *vein graft disease* (VGD), per averne una conoscenza completa, che consenta in prospettiva l'individuazione di un trattamento di prevenzione o cura del VGD.

La vena safena rappresenta, infatti, il sostituto di elezione per gli interventi di rivascolarizzazione; tuttavia, a causa delle differenze morfologiche, strutturali e funzionali e delle differenti condizioni emodinamiche caratteristiche del sistema venoso rispetto a quello arterioso, nel lungo termine si assiste al fallimento del graft venoso nel 50% dei casi.

In un lavoro di tesi precedente (Bono N. e Casadonte L., 2012 [7]), svolto sempre presso il μBSLab, è stato sviluppato, in seguito ad un'analisi dettagliata della letteratura, un sistema di coltura *ex vivo* in grado di ricreare i pattern di stimolazione pressoria arteriosa su segmenti di vena safena umana; la funzionalità del sistema è stata poi verificata con prove preliminari su segmenti di vena safena non utilizzabili per interventi CABG.

A partire da un'analisi dettagliata delle caratteristiche di questo sistema, il presente lavoro di tesi si è articolato come segue: la prima parte del lavoro progettuale è stata dedicata alla revisione della camera di coltura già esistente, al fine di ottimizzarla e risolverne alcune criticità, emerse durante le prove preliminari del sistema in esercizio presso il LIT. L'attività progettuale è stata quindi indirizzata al disegno di una nuova camera di coltura, caratterizzata dalla presenza di una compartimentazione dell'ambiente intraluminale dall'ambiente extra-avventiziale. Questa configurazione consente il diverso condizionamento dei due compartimenti; è infatti possibile riprodurre differenti ambienti

biochimici, far ricircolare cellule solamente nel compartimento intraluminale per studiarne l'*homing* oppure riprodurre diverse condizioni ematochimiche in termini di pO_2. Il lavoro si è focalizzato su quest'ultimo aspetto e, quindi, associato alla camera bicompartimentale è stato sviluppato un sistema di deossigenazione, finalizzato alla riproduzione delle condizioni ematochimiche caratteristiche del parenchima circostante la parete del vaso. Parallelamente all'attività di progettazione, presso il Centro Cardiologico Monzino è stata condotta una campagna sperimentale estensiva su segmenti di vena safena umana, volta allo studio del rimodellamento della parete vascolare in seguito alla stimolazione in condizioni CABG-like.

Nel Capitolo 1, dopo un accenno alla fisiologia e alla fisiopatologia delle arterie coronarie, saranno descritte le procedure chirurgiche di rivascolarizzazione con particolare attenzione rivolta all'utilizzo della vena safena nel bypass aorto-coronarico e al fallimento del graft venoso.

Nel Capitolo 2 sarà descritto lo stato dell'arte relativo ai sistemi di coltura *ex vivo* di segmenti vascolari, con particolare attenzione ai sistemi che consentono la generazione di pattern fluidodinamici caratteristici dell'ambiente arterioso.

Nel Capitolo 3 saranno illustrate le fasi di progettazione e realizzazione della camera di coltura ottimizzata, della camera di coltura bicompartimentale e del sistema di deossigenazione.

Nel Capitolo 4 saranno descritte inizialmente le prove di collaudo su banco del sistema bicompartimentale e del sistema di deossigenazione; si passerà quindi alla descrizione della verifica funzionale del sistema bicompartimentale messo in esercizio e utilizzato con segmenti di vena safena umana in prove preliminari. Infine, sarà descritta la campagna sperimentale estensiva con segmenti di vena safena umana, portata a termine utilizzando il bioreattore monocompartimentale ottimizzato e condotta parallelamente all'attività di progettazione del sistema bicompartimentale. Infine, saranno illustrati i protocolli di prova e di analisi del tessuto adottati.

Nel Capitolo 5 saranno presentati e discussi i risultati delle prove di collaudo su banco e in esercizio, con i campioni biologici di vena safena, del sistema bicompartimentale e del deossigenatore. Saranno riportati i risultati della campagna sperimentale e verranno discusse le evidenze riscontrate dalle analisi morfologiche e immunoistochimiche

effettuate sui campioni biologici prima e dopo la coltura in condizioni venose o in regime arterioso.

Alla luce dei risultati ottenuti saranno, quindi, tratte le considerazioni conclusive e brevemente introdotti alcuni possibili sviluppi del sistema oggetto del lavoro di tesi.

1.

Coronarie, bypass aorto-coronarico e vein graft disease

In questo capitolo, dopo una descrizione sintetica del circolo coronarico e delle coronaropatie, saranno introdotte le tecniche chirurgiche di rivascolarizzazione; saranno, quindi, elencati i graft più comunemente utilizzati nel bypass aorto-coronarico, focalizzando l'attenzione sulla grande vena safena. Infine, saranno descritti i meccanismi alla base e le implicazioni del *vein graft disease* (VGD).

1.1 Le coronarie

La funzione del circolo coronarico è quella di garantire un corretto apporto di ossigeno e nutrienti al tessuto del miocardio e, nel contempo, rimuovere i cataboliti delle reazioni cellulari [8]. Esso è costituito da vasi di medio e piccolo calibro che distribuiscono una portata di sangue pari a 250 ml/min (circa il 5% della gittata cardiaca), adeguata alla richiesta metabolica del cuore che, in condizioni basali, consuma 6.5-10 mlO_2/min ogni 100 g di tessuto [9]. Le principali arterie coronariche giacciono sulla superficie del cuore e le arterie di piccolo calibro penetrano dalla superficie nella massa del muscolo cardiaco; è da queste che il cuore riceve quasi interamente il suo apporto sanguigno poiché solo la superficie interna dell'endocardio per uno spessore di 75-100 μm può ottenere quantità significative di nutrienti direttamente dal sangue delle cavità cardiache [10].

Le arterie coronarie originano dal seno di Valsalva, in prossimità dell'anello valvolare aortico, si diramano e vanno ad irrorare, con un elevato rapporto tra il numero di capillari e il numero di cardiomiociti il tessuto miocardico. La coronaria destra va ad irrorare il ventricolo destro e la metà posteriore del setto, mentre la coronaria sinistra il ventricolo

sinistro e la metà anteriore del setto (Figura 1.1). All'apice del cuore esistono molte anastomosi tra i due rami che costituiscono un elemento di sicurezza, riducendo l'area ischemica in caso di occlusione di un ramo. Il circolo è completato dalle vene coronarie, nelle quali confluisce il sangue deossigenato che viene riversato nel seno coronarico e, successivamente, nell'atrio destro [9].

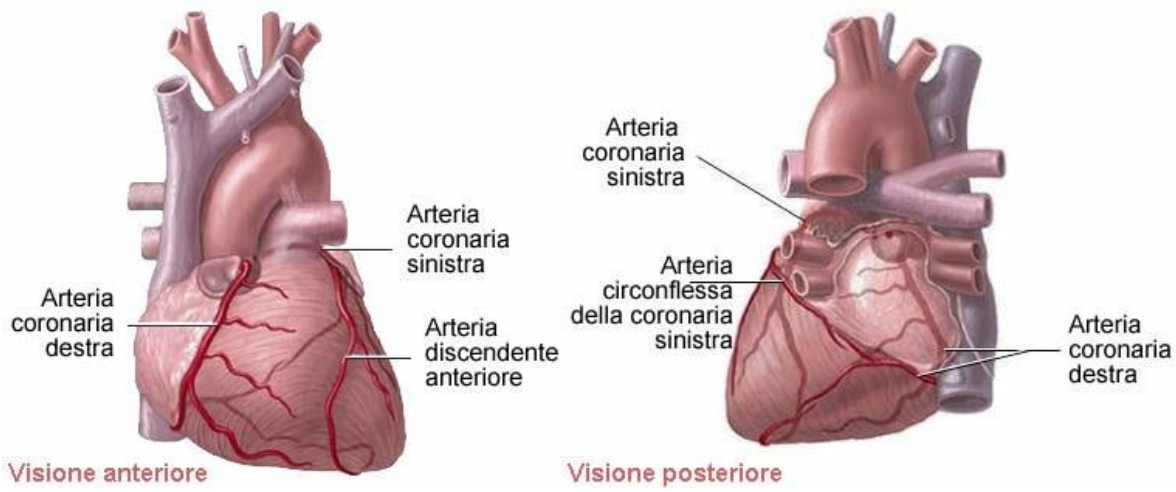


Figura 1.1 *Circolo coronarico: visione anteriore (a sinistra) e visione posteriore (a destra). Si nota l'origine delle arterie coronarie destra e sinistra ed il loro decorso sulla superficie del miocardio.*

Durante la fase di sistole la contrazione ventricolare determina la temporanea occlusione dei piccoli vasi coronarici, soprattutto di quelli situati più in profondità. La maggior parte del flusso coronarico (il 70-90%) avviene, quindi, durante la diastole.

Il flusso nell'arteria coronaria sinistra diminuisce bruscamente all'inizio del periodo di contrazione isometrica e può divenire addirittura retrogrado per un breve periodo di tempo, ad indicare che la chiusura del letto capillare cardiaco può respingere il sangue nelle arterie coronarie. Durante il periodo di eiezione il flusso nelle coronarie aumenta, per poi diminuire nuovamente con la successiva sistole (Figura 1.2). Il flusso nei capillari coronarici del ventricolo destro subisce ugualmente variazioni durante il ciclo cardiaco che si rivelano, però, assai minori in quanto la forza di contrazione del ventricolo destro è largamente inferiore rispetto a quella del ventricolo di sinistra [9, 10]. A causa di questo fenomeno di compressione vascolare l'endocardio è più suscettibile a fenomeni ischemici in condizioni di basse pressioni di perfusione. In caso di tachicardia, inoltre, il tempo disponibile affinché in diastole abbia luogo il flusso coronarico è relativamente inferiore; questo è particolarmente significativo nei pazienti affetti da coronaropatie in cui la

massima capacità di flusso è ridotta. Nei soggetti affetti da queste patologie, inoltre, la riduzione del flusso coronarico può associarsi all'aumento dell'estrazione di ossigeno, già pari al 70% in condizioni normali di riposo, con conseguente ipossiemia dei tessuti e *angina* (dolore cardiaco che si manifesta nei casi in cui il carico di lavoro per il cuore risulti eccessivo in rapporto al flusso coronarico) [8].

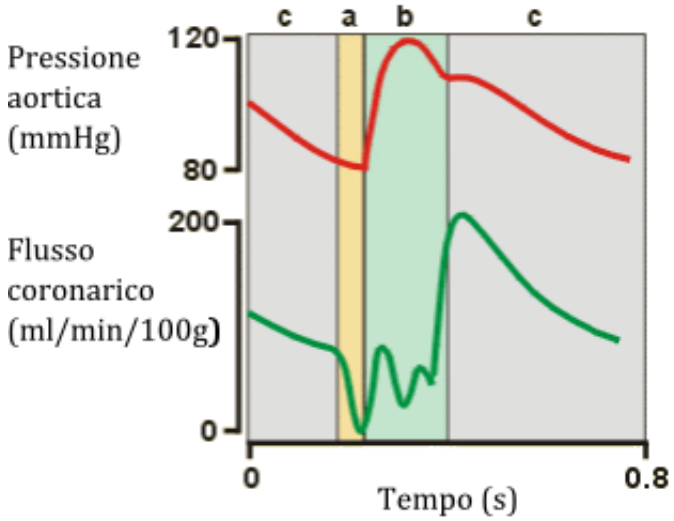


Figura 1.2 *Natura pulsatile del flusso nell'arteria coronaria sinistra. Il flusso è minore durante le fasi di contrazione isovolumetrica (a) e di eiezione (b) rispetto alla fase diastolica (c); l'unità di misura del flusso coronarico è riferita ai grammi di tessuto cardiaco. Adattato da [8].*

1.2 Le coronaropatie: incidenza sulla popolazione ed impatto sociale

Si definisce coronaropatia (CHD – *Coronary Heart Disease*) una condizione patologica caratterizzata dal restringimento o dall'occlusione di uno o più rami del circolo coronarico, con conseguente insufficienza dell'apporto ematico al muscolo cardiaco. La causa più frequente (90-95% dei casi [11]) della diminuzione del flusso coronarico è l'aterosclerosi (CAD – *Coronary Artery Disease*). In soggetti predisposti geneticamente, o che consumino eccessive quantità di colesterolo e altri grassi, avviene il graduale deposito di notevoli quantità di colesterolo a livello delle arterie. Questi depositi vengono invasi da tessuto fibroso e tendono a calcificarsi, formando placche aterosclerotiche che protrudono nel lume del vaso, bloccando il flusso ematico (Figura 1.3). In alcuni casi, invece, l'occlusione può essere improvvisa, causata da spasmi locali della parete vascolare[10].

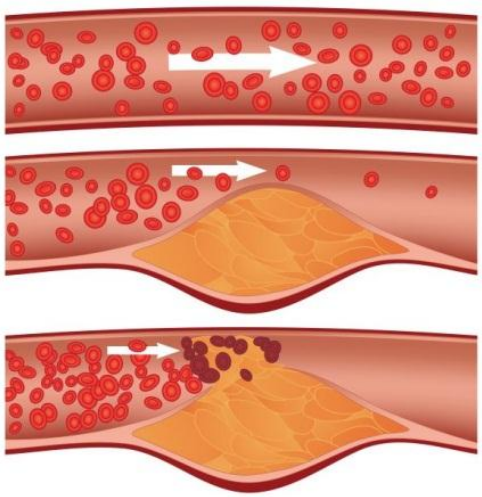


Figura 1.3 *Progressione dell'aterosclerosi: vaso completamente pervio (in alto), placca aterosclerotica significativa (al centro), completa occlusione con formazione di coagulo (in basso).*

Si parla di stenosi emodinamicamente significativa quando questa occupa più del 70% del lume. Spesso è possibile che si creino dei circoli collaterali che sostengono la perfusione nelle regioni distali rispetto alla stenosi, tuttavia, questi circoli possono rivelarsi insufficienti ed il paziente va incontro comunque ad un evento ischemico. Nei casi più gravi di riduzione dell'apporto di sangue il tessuto cardiaco diviene necrotico. In condizioni di infarto miocardico l'area interessata perde, parzialmente o totalmente, la sua funzione.

Dalla stima annuale realizzata dall'*American Heart Association* nel 2012 (sulla base di dati relativi al 2008) emerge che, negli Stati Uniti, il 32.8% del numero totale dei decessi sia da attribuire a malattie cardiovascolari (CVDs – *Cardio Vascular Diseases*) (Figura 1.4a); nel 18% dei casi i soggetti avevano età inferiore ai 65 anni, nel 33% inferiore ai 75 anni.

Le coronaropatie sono state causa di un sesto del totale dei decessi del 2008 negli Stati Uniti (Figura 1.4b) e, si stima, che ogni anno circa 800 mila americani svilupperanno una nuova patologia coronarica. Nella relazione della *American Heart Asoosciation* è riportato, inoltre, che nel 2009 negli Stati Uniti 242 mila pazienti sono stati sottoposti a 416 mila interventi di bypass aorto-coronarico (CABG – *Coronary Artery Bypass Grafting*) [11].

Dati aggiornati al 2007 [11], indicano in Italia una mortalità per malattie cardiovascolari pari al 25.66% per gli uomini (età compresa tra i 35 e i 74 anni) e al 20.64% per le donne (età compresa tra i 35 e i 74 anni) e, per quanto riguarda le coronaropatie, una mortalità del 12.1% per gli uomini e del 6.81% per le donne.

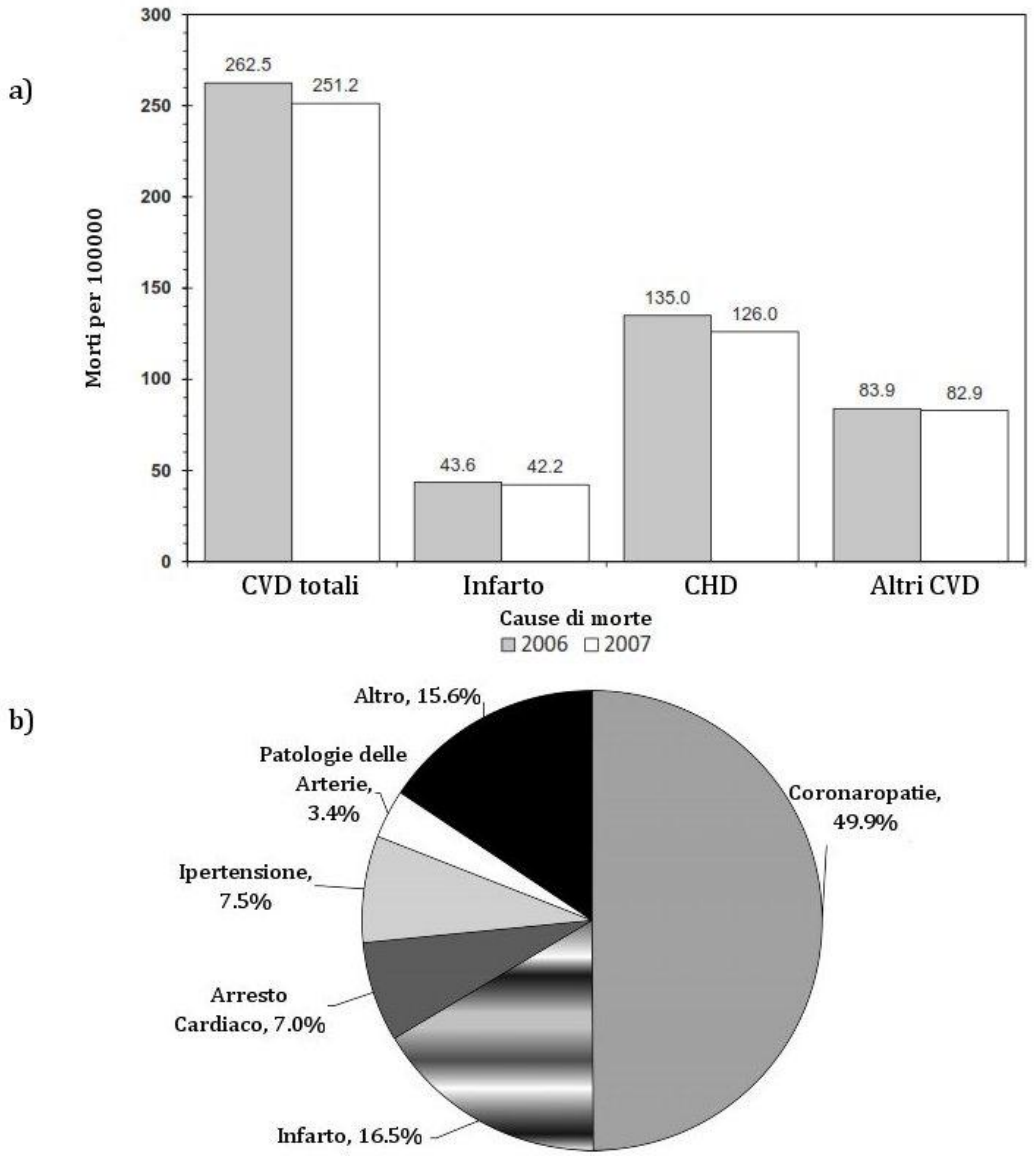


Figura 1.4 *Suddivisione percentuale delle cause di morte per CVD. Dati relativi alla popolazione americana. Adattata da [11].*

In Figura 1.5 si può osservare come l'incidenza delle malattie cardiovascolari sia determinata da fattori di salute e da fattori comportamentali; la conformità al maggior numero di fattori, e cioè l'assenza di patologie e la conduzione di uno stile di vita sano, si associa ad una bassa percentuale di insorgenza di CVD. Come fattori di salute si considerano i livelli di colesterolo nel sangue (< 200 mg/dL), i valori di pressione sanguigna (80-120 mmHg), il non essere fumatore e l'assenza di patologie diabetiche (valori di glucosio nel sangue < 100 mg/dl); come fattori comportamentali si considerano una buona attività fisica, ancora il non essere fumatore, l'assenza di sovrappeso o obesità (indice di massa corporea < 25 kg/m^2) e una dieta equilibrata.

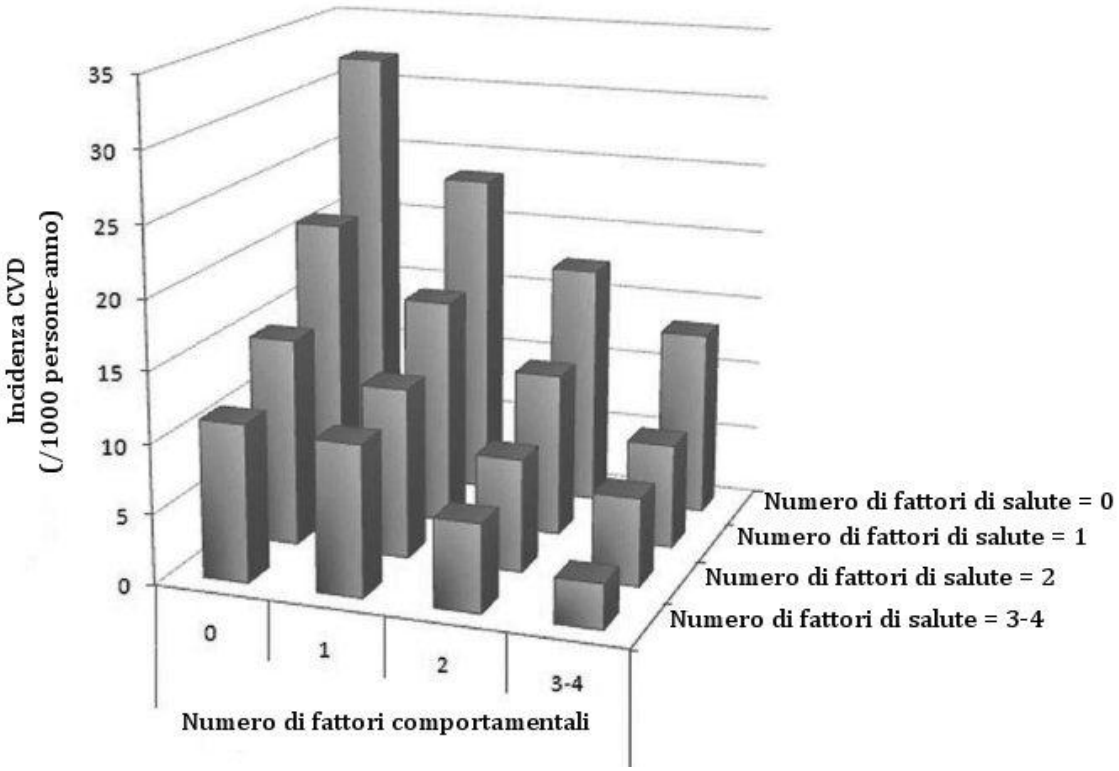


Figura 1.5 *Incidenza dei CVD in rapporto al numero di fattori di buona salute e al numero di buoni fattori comportamentali Adattata da [11].*

Confrontando i dati di mortalità per CVD e CHD con i dati relativi all'aspettativa di vita alla nascita, trascurando in questo contesto i paesi del terzo mondo e quelli in via di sviluppo, emerge quanto gravino queste patologie sulle società moderne. Tenendo conto dell'elevata percentuale dei soggetti colpiti, della frequente recidiva della patologia e dei conseguenti costi della spesa sanitaria, appare evidente la necessità di ottimizzare i trattamenti attuali e, parallelamente, sviluppare nuove strategie di approccio alla patologia.

1.3 Trattamento delle coronaropatie: angioplastica e bypass aorto-coronarico

Nella descrizione dei trattamenti delle malattie coronariche è possibile operare una suddivisione tra le terapie chirurgiche tradizionali, ormai assodate e di normale uso in ambito clinico, e le possibili future terapie innovative che coinvolgono l'utilizzo di

biomateriali e di prodotti dell'ingegneria dei tessuti, su cui si sta orientando la ricerca negli ultimi anni.

Tra gli approcci tradizionali rientrano l'angioplastica coronarica, eventualmente associata al posizionamento di uno *stent*, e gli interventi di CABG.

La tecnica chirurgica che prende il nome di CABG, introdotta già nel 1968 è finalizzata a ripristinare il corretto apporto di sangue al tessuto a valle di un'occlusione mediante la realizzazione di un ponte (i.e. il bypass): un tratto di vaso sano, prevalentemente vena safena o arteria mammaria interna, viene anastomizzato con la coronaria a valle del restringimento in modo da creare un ramo pervio, parallelo al vaso originario.

L'angioplastica coronarica è stata introdotta nel 1977 come alternativa minimamente invasiva rispetto al tradizionale bypass. Consiste nell'introduzione, attraverso l'arteria femorale o, in alternativa, attraverso l'arteria radiale, di un catetere di diametro pari a 1 mm sulla cui punta è montato un palloncino. Il palloncino viene posizionato a livello della stenosi e gonfiato mediante l'iniezione di un liquido ad alta pressione (6-8 atmosfere in media), distendendo l'arteria nel punto di occlusione e ripristinandone, quindi, la pervietà. Questa procedura può essere associata al posizionamento di uno *stent*, una struttura metallica cilindrica a maglie, che viene precedentemente montata sul catetere a livello del palloncino; al momento dell'espansione del palloncino anche lo *stent* si dilata e resta collocato nel lume dell'arteria al fine di prevenire una ristenosi in quel punto (Figura 1.6).

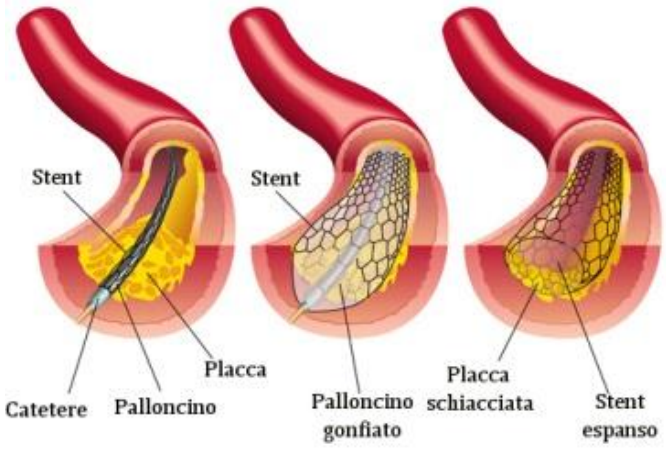


Figura 1.6 *Angioplastica con palloncino associata al posizionamento di stent.*

Esistono linee guida che indicano ai medici quale tra le tecniche chirurgiche citate sia più adeguata in base alla natura e all'estensione della coronaropatia del paziente. Secondo un trial clinico, condotto in conformità con le *Good Clinical Practice,* quindi prospettico, randomizzato e multicentrico, emerge che, per quanto riguarda i pazienti in fase acuta

l'approccio da seguire sia quello angioplastico, mentre, per i soggetti in fase non acuta e che presentino patologie multivasali il bypass rappresenti il trattamento di elezione [12]. In un secondo trial clinico pazienti con patologie multivasali sono stati sottoposti o all'impianto di *stent* o a bypass in modo random. A un anno dall'intervento, è emerso che i due approcci si equivalgono in termini di mortalità e insorgenza di infarto miocardico, tuttavia per i pazienti appartenenti al primo gruppo è stata significativamente maggiore la percentuale dei reinterventi [13].

Il CABG risulta, quindi, la tecnica chirurgica più utilizzata per il trattamento delle coronaropatie; viene eseguito in quei casi in cui non sia consigliato intervenire mediante angioplastica, ovvero nei casi in cui la stenosi sia molto severa o interessi le coronarie in più punti, nei casi in cui il punto dell'occlusione non sia raggiungibile mediante catetere e nei casi in cui si debba trattare una ristenosi di un tratto sottoposto precedentemente allo stesso trattamento.

1.4 Vasi utilizzati nel bypass aorto-coronarico

I vasi più utilizzati come bypass sono l'arteria mammaria interna, che decorre all'interno della cassa toracica, subito dietro lo strerno, e la grande vena safena, che decorre nel versante interno degli arti inferiori. Talvolta, nei casi in cui questi vasi non siano disponibili, si ricorre all'impiego dell'arteria radiale, collocata nell'avambraccio.

Sebbene i risultati di CABG con vasi autologhi siano molto positivi, questa procedura presenta alcuni limiti che spingono verso la ricerca di un approccio differente. Infatti, alcuni pazienti (circa il 10-25%) non possiedono vasi autologhi utilizzabili per il bypass; i problemi possono essere legati sia a possibili precedenti asportazioni, sia alla presenza di patologie, sia alle dimensioni. Inoltre, anche qualora siano disponibili vasi autologhi con caratteristiche adeguate, è importante considerare che per ogni paziente la disponibilità di vasi utilizzabili è limitata e che la durata dell' intervento è maggiore, richiedendo un duplice campo operatorio, prima, per l'estrazione del vaso e, successivamente, per il suo reinnesto [14]. Inoltre, va evidenziato che l'affidabilità a lungo termine dei graft venosi autologhi non è ottima: a un anno dall'intervento la percentuale di ristenosi dei graft venosi è del 15%, a tre anni del 20%, a sei anni del 30% e del 40-50% a dieci anni. Per quanto concerne i graft arteriosi le percentuali sono 1%, 5%, 7% e 13% in corrispondenza degli

stessi intervalli temporali [15]. In generale, il graft vascolare ideale dovrebbe possedere una serie di caratteristiche, riportate in dettaglio in Tabella 1.1, tra cui la biocompatibilità, la compatibilità dal punto di vista delle proprietà meccaniche, fisiche e chimiche, il mantenimento della pervietà a lungo termine, la facilità di ottenimento ed impiego e la sterilità.

Biocompatibilità	Nessun disturbo al processo di guarigione
	Atossicità
	Anallergenicità
	Assenza di cancerogenicità
	Assenza di trombogenicità
	Resistenza alle infezioni
Complianza	Flessibilità, elasticità
	Resistenza all'iperplasia dell'intima
Processabilità	Adeguate proprietà fisico-chimiche
	Resistenza meccanica
	Disponibilità immediata in varie misure
	Facilmente conservabile
	Facilmente suturabile
	Sterilizzabile

Tabella 1.1 *Caratteristiche del graft vascolare ideale. Adattata da [16].*

Prima di procedere con la descrizione dei vasi utilizzati nel CABG è opportuno soffermarsi ad analizzare la struttura e le proprietà meccaniche dei vasi sanguigni in quanto è da queste che dipende principalmente il comportamento dei vasi utilizzati come graft. Sarà quindi trattato, brevemente, l'impiego di vasi ingegnerizzati e di protesi artificiali, come alternative ai graft autologhi, che verranno poi descritti in modo più approfondito con particolare attenzione per la vena safena e per il VGD.

1.4.1 Struttura e proprietà meccaniche dei vasi sanguigni

La parete vascolare è un tessuto connettivo dalla struttura stratificata che presenta notevoli differenze in relazione alla tipologia di vaso. In generale, la parete vascolare è

costituita da tre strati concentrici che, procedendo dall'interno verso l'esterno, sono: la tunica intima, la tunica media, la tunica avventizia (Figura 1.7). Gli elementi strutturali che, in proporzioni diverse a seconda del tipo di vaso, vanno a comporne gli strati sono le cellule endoteliali (*Endothelial Cells* – EC), le fibre di elastina, le fibre di collagene e le fibre muscolari lisce.

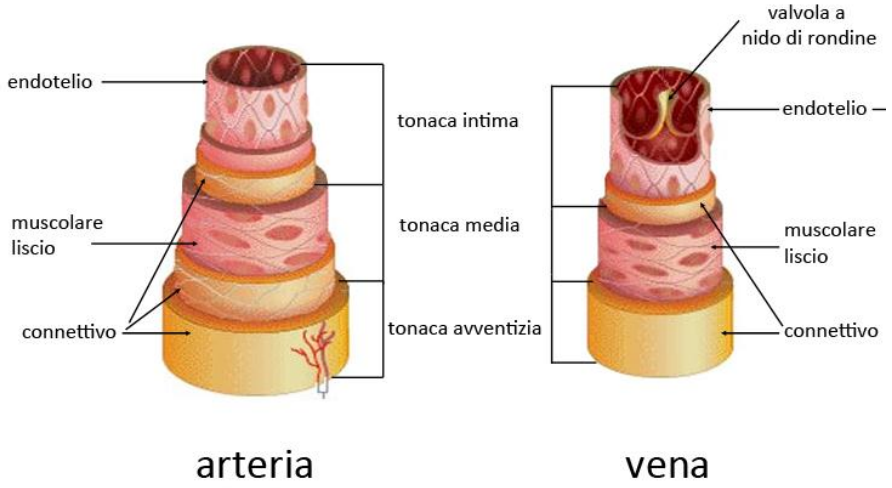


Figura 1.7 *Struttura anatomica di un'arteria e di una vena a confronto.*

La tunica intima è costituita da un singolo strato di EC, direttamente a contatto con il sangue che scorre all'interno del vaso, e dalla membrana basale, contenente fibre di collagene. Tra l'intima e la media è interposta la lamina elastica interna costituita da lamine di elastina.

La media costituisce, generalmente, lo strato più spesso della parete ed è caratterizzata da componenti in percentuali differenti nelle diverse regioni del sistema vascolare. Nelle grandi arterie, più prossime al cuore, essa è costituita da lamine elastiche fenestrate alternate a fibre di collagene e cellule muscolari lisce (*Smooth Muscle Cells* – SMC); nelle arterie più piccole e nelle vene, invece, è costituita soprattutto da SMC e da una piccola parte di tessuto connettivo, costituito da collagene ed elastina.

Infine la tunica avventizia, separata dalla media da un'ulteriore lamina elastica, è composta prevalentemente da fasci di fibre di collagene non compatti in direzione longitudinale ed in minore misura da fibre di elastina e SMC. Questo strato protegge il vaso e ne permette l'ancoraggio ad altre strutture, formando una struttura continua tra il vaso e i tessuti circostanti. La tunica avventizia è attraversata, inoltre, da fibre nervose e vasi linfatici. Nel caso di vasi di grandi dimensioni, essa è perfusa da un sistema di piccoli vasi, detti *vasa vasorum*, deputati al trasporto di ossigeno e sostanze nutritive ai tessuti della parete [17].

Un ulteriore elemento distintivo nella struttura di vene e arterie è la presenza, all'interno delle prime, di valvole unidirezionali, le cosiddette valvole "a nido di rondine" (Figura 1.8), che impediscono il flusso retrogrado di sangue che potrebbe aver luogo a causa delle basse pressioni che caratterizzano i tratti venosi del sistema circolatorio, insufficienti a spingere il flusso sanguigno contro la forza gravitazionale. Inoltre, la presenza di queste strutture contribuisce all'impedenza del flusso laminare attraverso la vena [1].

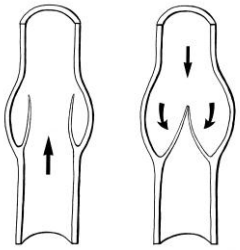


Figura 1.8 *Valvole "a nido di rondine".*

Le proprietà meccaniche del vaso sono determinate dalle proprietà meccaniche degli elementi che costituiscono la parete del vaso (elastina, collagene, fibre muscolari), presenti in proporzioni diverse in vene e arterie. In Figura 1.9 sono schematizzate le quantità degli elementi strutturali nelle diverse tipologie di vaso al variare del calibro; si nota come nelle grandi arterie il contenuto di elastina sia molto più significativo rispetto alle vene nelle quali, invece, è maggiore il contenuto di fibre di collagene. L'elastina è una proteina strutturale con elevate proprietà elastomeriche, ha basso modulo elastico ($E \approx 0.6$ MPa [18]) e un comportamento meccanico, in prima approssimazione, elastico-lineare.

	aorta	arterie	arteriole	capillari	venule	vene	vena cava
diametro	2 cm	4 mm	30 μm	8 μm	40 μm	5 mm	3 cm
spessore della parete	2 mm	1 mm	20 μm	1 μm	2 μm	0,5 mm	1,5 mm
spessore della parete / raggio	1/5	1/2	>1	1/4	1/10	1/5	1/10
endotelio							
elastina							
muscolo liscio							
collagene							

Figura 1.9 *Caratteristiche morfologiche e strutturali dei vasi. Adattata da [17].*

La funzione di queste fibre è di produrre senza spesa energetica una tensione elastica, che si oppone alla forza distensiva della pressione sanguigna. Le fibre elastiche giocano un ruolo fondamentale durante il normale funzionamento pulsatile delle arterie: accumulano un importante volume di sangue durante la sistole cardiaca per poi espellerlo verso la periferia durante la successiva fase di sistole (Figura 1.10); in tal modo il carattere pulsatile del flusso sanguigno si smorza lungo l'albero arterioso.

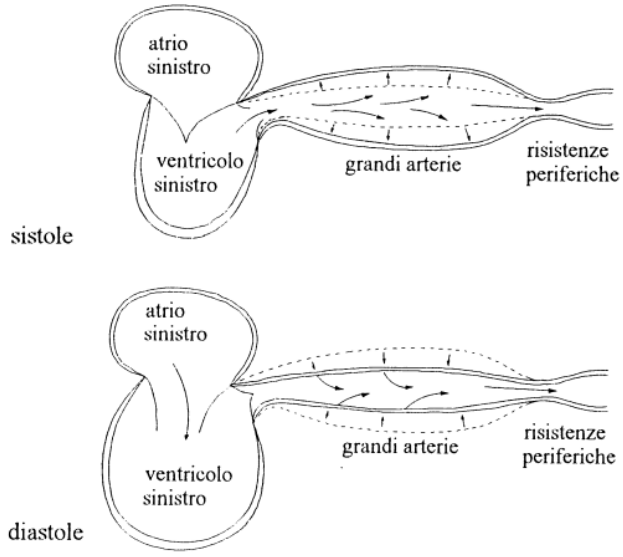


Figura 1.10 *Comportamento elastico delle grandi arterie e loro ruolo nello smorzamento della pulsatilità del flusso sanguigno.*

Il collagene è una proteina con funzioni strutturali e meccaniche, con modulo di elasticità molto maggiore rispetto a quello dell'elastina ($E \approx 1$ GPa [18]); il suo comportamento è fortemente viscoelastico e le fibre che va a comporre entrano in azione progressivamente quando le sollecitazioni pressorie superano il range di funzionamento normale, compreso tra 80 e 120 mmHg.

La funzione delle fibre di elastina e di collagene è mantenere una tensione uniforme che equilibri la pressione esercitata dal flusso sanguigno tra l'interno e l'esterno del vaso.

La muscolatura liscia svolge una funzione di vasoregolazione attiva che permette la variazione del diametro del lume del vaso in funzione dei fattori chimici rilasciati dalle EC vascolari. Le SMC sono orientate in direzione circonferenziale e il loro numero e la loro distribuzione influenzano la rigidezza del tessuto.

I diversi rapporti tra questi elementi determinano le diverse proprietà meccaniche di arterie e vene: l'abbondanza di elastina e fibre di collagene rende le arterie consistenti, comprimibili e dotate di grande deformabilità elastica; viceversa, la predominanza di

strutture fibrose e fasci muscolari, rispetto agli elementi elastici, rende le vene più soggette al collasso per effetto di pressioni esercitate dall'esterno [17].

L'indice di *compliance* rende possibile quantificare queste differenze biomeccaniche. La *compliance* esprime la capacità dei vasi sanguigni di dilatarsi elasticamente per effetto di una pressione crescente, per poi tornare al volume iniziale, restituendo il volume di sangue accumulato, per effetto di una pressione decrescente. La *compliance* (C) definisce, quindi, la misura del rapporto tra l'aumento pressorio (ΔP) e il conseguente aumento di volume (ΔV) del vaso.

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

Le fibre elastiche presentano elevata *compliance*, mentre, le fibre di collagene sono fibre a bassa *compliance*; i diversi rapporti tra elastina e collagene all'interno di vene e arterie determinano i diversi valori di *compliance* nei due tipi di vasi.

A parità di calibro e portata sanguigna supportata, a bassi regimi pressori una vena mostrerà valori di *compliance* circa venti volte maggiori di un'arteria (Figura 1.11); questo esplica la capacità delle vene di accogliere ingenti volumi di sangue in seguito a piccole variazioni della pressione all'interno.

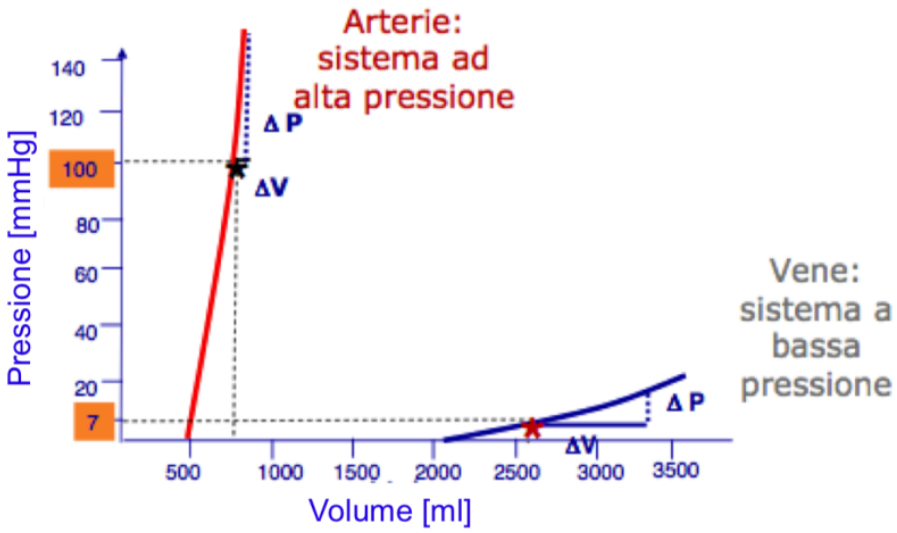


Figura 1.11 *Curve Pressione-Volume di un vaso del sitema arterioso e di un vaso del sistema venoso.*

1.4.2 Protesi vascolari e sostituti vascolari ingegnerizzati

La realizzazione di sostituti vascolari artificiali è stata presa in considerazione come possibile soluzione ai limiti dei graft autologhi. Tuttavia, sebbene vasi sintetici realizzati in politetrafluoroetilene espanso (ePTFE) e in Dacron (fibre tessute di polietilentereftalato) con diametri maggiori di 5 mm siano impiegati con successo, le protesi vascolari sintetiche di piccolo calibro mostrano elevata trombogenicità e valori di *compliance* incompatibili con quelli del vaso naturale a cui la protesi è anastomizzata [16].

Oltre al campo dei biomateriali, è soprattutto nel campo dell'ingegneria dei tessuti che si sta investendo molto per la realizzazione di sostituti vascolari ingegnerizzati (*Tissue-Engineered Blood Vessels* – TEBVs), al fine di rendere disponibili per gli interventi di CABG vasi biologici ma che non presentino le problematiche e i limiti dei vasi autologhi. Poiché la loro finalità è quella di sostituire arterie coronarie patologiche, ai sostituti vascolari è richiesto di essere progettati in modo da presentare struttura, fisiologia e proprietà meccaniche più simili possibile a quelle dei vasi naturali. Il raggiungimento di questi obiettivi dipende dalla combinazione ottimale di tre elementi, vale a dire, la componente cellulare, i materiali utilizzati come scaffold per la maturazione del costrutto, la stimolazione meccanica applicata. Lo standard per le protesi vascolari ANSI/AAMI/ISO 7198:1998/2001 stabilisce che le proprietà meccaniche dei TEBV, la *compliance*, la forza di tenuta delle suture, la viscoelasticità e lo sforzo a rottura debbano essere confrontabili con quelle dei vasi nativi che andrebbero a sostituire. In ultimo, ma non meno importante, i vasi bio-artificiali non dovrebbero scatenare processi infiammatori né risposta immunitaria e non dovrebbero andare incontro a rimodellamento incontrollato in seguito all'impianto [3].

Sebbene l'approccio protesico e l'approccio dell'ingegneria tessutale presentino numerose potenzialità e costituiscano possibili soluzioni verso l'abbandono dell'utilizzo di vasi autologhi nel CABG, ad oggi l'utilizzo di questi ultimi rappresenta ancora la soluzione clinica di elezione.

1.4.3 Arteria mammaria interna

L'arteria mammaria interna sinistra origina dall'arteria succlavia; in fase di intervento di CABG, vengono rimossi i vasi collaterali e la parte terminale viene anastomizzata con il ramo coronarico lasciando, però, intatta l'origine. Il vantaggio è duplice, anzitutto viene

utilizzata un'arteria, cioè un condotto con le stesse caratteristiche meccaniche del vaso originario, quindi più adatte a sopportare i regimi pressori che caratterizzano quel ramo del sistema circolatorio. In secondo luogo, non è necessario creare un'anastomosi con l'aorta poiché l'afflusso di sangue viene mantenuto dalla succlavia, lasciata *in situ*.

Può essere utilizzata anche l'arteria mammaria destra, in questo caso il vaso non viene lasciato in situ e si realizza una conformazione a Y anastomizzando il vaso, a valle, con il ramo coronarico e, a monte, con l'arteria mammaria di sinistra.

L'utilizzo di condotti arteriosi toracici nel CABG, favorevole per quanto riguarda la compatibilità delle proprietà meccaniche, presenta alcuni problemi tra cui la lunghezza limitata che li rende inutilizzabili nei bypass multipli, lo spasmo del graft e la progressione della malattia coronarica distalmente al sito di anastomosi o a livello del graft stesso.

1.4.4 Grande vena safena

La grande vena safena è un vaso sanguigno superficiale situato in entrambi gli arti inferiori. Essa origina nel punto in cui la vena dorsale dell'alluce confluisce nell'arco venoso dorsale del piede e, dopo aver percorso anteriormente il malleolo mediale, corre lungo la parte mediale della gamba. All'altezza del ginocchio percorre il bordo posteriore dell'epicondilo mediale femorale, quindi, decorre lungo la superficie anteriore della gamba prima di congiungersi con la vena femorale superficiale, a livello della giunzione safeno-femorale (Figura 1.12).

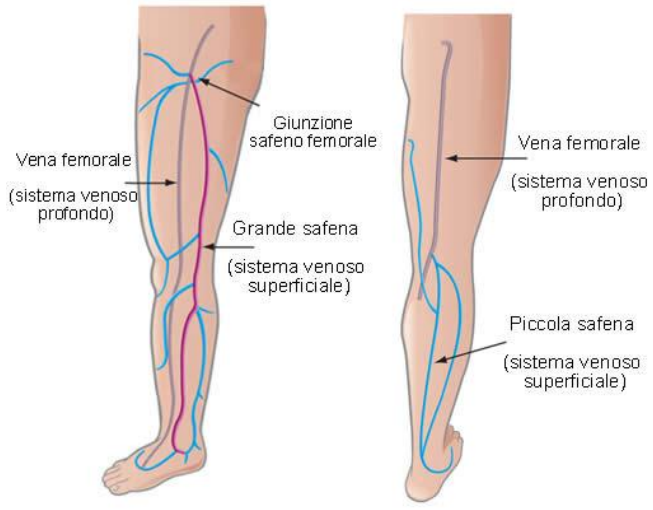


Figura 1.12 *Sistema circolatorio degli arti inferiori.*

Grazie alla relativa facilità di asportazione, grazie al decorso superficiale, alla lunghezza significativa del vaso, che la rende utilizzabile in graft multipli, e al diametro, tra 4 e 6 mm in media, paragonabile a quello delle arterie coronariche, la vena safena rappresenta il sostituto di elezione per i bypass aorto-coronarici [1].

Pionieri dell'impiego della vena safena come graft nel bypass aorto-coronarico furono, nel 1967, Garrett e colleghi [19]; non lontano da questa data, però, vari report dimostrarono, attraverso esami angiografici, il fallimento del graft circa nel 50% dei casi entro 10-15 anni dall'intervento (Figura 1.13) [20].

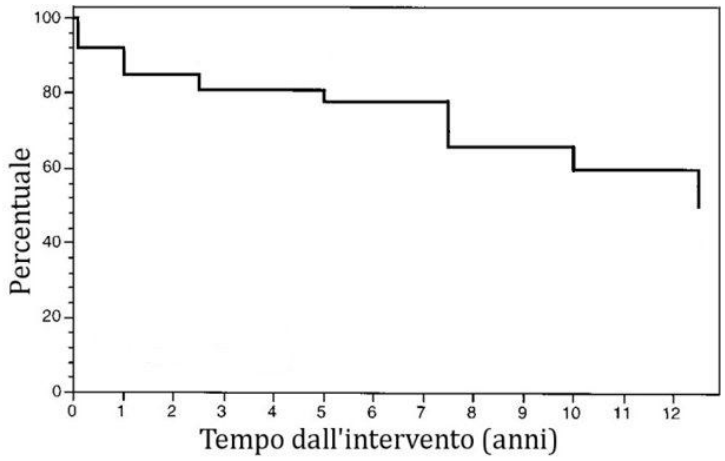


Figura 1.13 *Pervietà del graft venoso nel tempo. Adattata da [19].*

1.5 Vein graft disease

In seguito alla trasposizione in ambiente arterioso la vena passa da un sistema caratterizzato da basse pressioni (5-10 mmHg), basse portate non pulsatili e basso *shear stress* (0.1-0.6 Pa) ad un ambiente ad alta pressione (60-140 mmHg), portate elevate e pulsatili (in media 200-250 ml/min) e *shear stress* maggiore (1-7 Pa) [2]. L'adattamento del graft a queste condizioni e un grado limitato di iperplasia dell'intima (IH – *Intimal Hyperplasia*) sono considerati elementi importanti per il successo del graft. Tuttavia un adattamento anormale e incontrollato conduce ad un rimodellamento abnorme del vaso, a un'eccessiva IH e, in ultimo, al fallimento del graft e alle conseguenti complicazioni cliniche (

Figura **1.14**) [1].

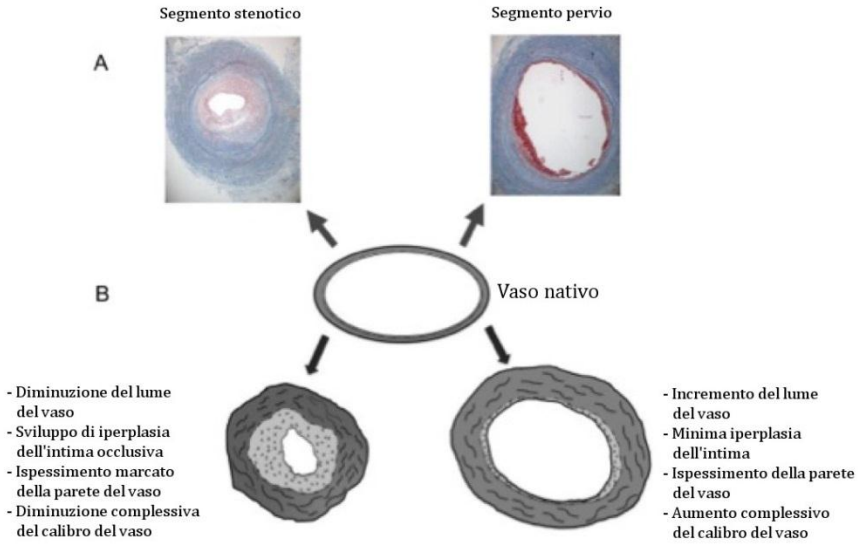

Segmento stenotico
Segmento pervio
A
B
Vaso nativo
- Diminuzione del lume del vaso
- Sviluppo di iperplasia dell'intima occlusiva
- Ispessimento marcato della parete del vaso
- Diminuzione complessiva del calibro del vaso
- Incremento del lume del vaso
- Minima iperplasia dell'intima
- Ispessimento della parete del vaso
- Aumento complessivo del calibro del vaso

Figura 1.14 *Sezione istologica di un graft venoso a otto mesi dall'impianto; si nota la discrepamza tra rimodellamento patologico del vaso (a sinistra) e rimodellamento corretto (a destra). Adattata da [21].*

Tre processi sono responsabili di quello che viene definito *vein graft disease* (VGD), o arterializzazione: trombosi, IH e aterosclerosi che contribuiscono al fallimento del graft rispettivamente nel breve, nel medio e nel lungo termine.

Le principali componenti cellulari delle pareti venose sono le EC e le SMC. Le ECs formano un monostrato sulla membrana basale ed hanno un ruolo importante nel mantenimento dell'integrità e della funzionalità della parete del vaso. Le EC rilasciano sostanze, tra cui l'ossido d'azoto, che contribuiscono a prevenire l'attivazione, l'adesione e l'aggregazione piastrinica. L'interazione tra le SMCs e la matrice extracellulare (*Extra Cellular Matrix* – ECM), invece, promuove il mantenimento delle SMCs in uno stato quiescente. La parete venosa è, inoltre, in condizioni normali, caratterizzata da basso turnover cellulare, bassi tassi di proliferazione e di apoptosi.

Cinque sono gli eventi cellulari che portano alla formazione di neointima: l'attivazione piastrinica e della risposta infiammatoria, l'attivazione della cascata coagulatoria, la migrazione di SMC e la loro proliferazione (Figura 1.15).

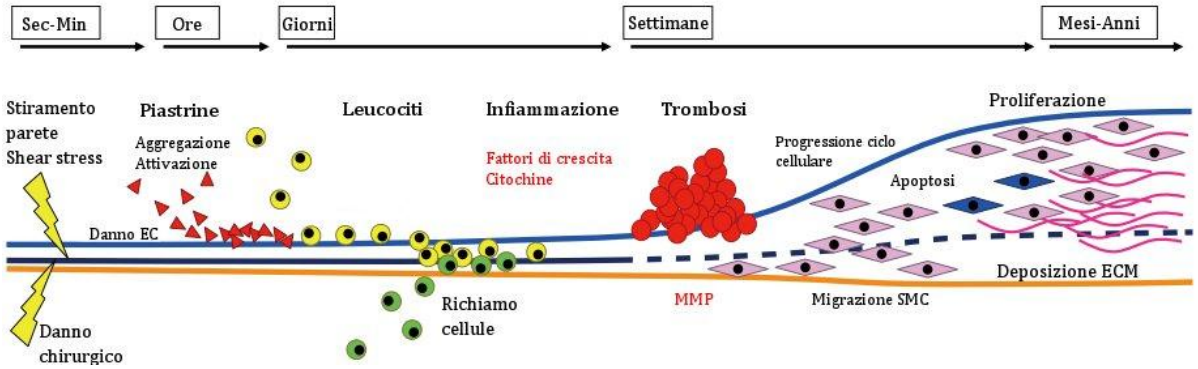


Figura 1.15 *Evoluzione temporale dei fenomeni coinvolti nel fallimento del graft venoso (MMP: metalloproteasi della matrice; ECM: matrice extracellulare). Adattata da [1].*

Il primo elemento scatenante dell'intero processo è la procedura chirurgica di espianto (*harvesting*) della vena che comporta un danno all'avventizia e la rimozione dei *vasa vasorum* con conseguente ipossia del tessuto e rilascio di elementi della risposta infiammatoria. Al momento dell'espianto, inoltre, la vena viene distesa manualmente, al fine di evitarne spasmi; questa procedura è responsabile del danneggiamento dello strato endoteliale. In seguito alla trasposizione a livello coronarico la vena è immediatamente esposta a intense forze di deformazione e *shear stress*, queste inducono le cellule della parete a entrare in apoptosi e, successivamente, a proliferare. Il processo è determinato dall'attivazione una cascata di segnali intracellulari che inducono, in ultimo, cambiamenti fenotipici delle SMCs che da uno stato quiescente e contrattile evolvono in uno stato migratorio e proliferativo. Le diverse condizioni di flusso, inoltre, causano, la denudazione del vaso, ossia la perdita dell'endotelio. Il danno all'endotelio comporta, anzitutto un deficit nella produzione dell'ossido nitrico, fondamentale per l'omeostasi, e, in secondo luogo, l'adesione e l'aggregazione piastrinica, entro un minuto dall'impianto. Nella prima settimana dall'intervento il richiamo di leucociti e la risposta infiammatoria, innescata dall'attivazione piastrinica, svolgono il ruolo principale nell'adattamento del graft. Inoltre, a livello del danno endoteliale, responsabile dell'innesco del processo di coagulazione, si ha accumulo di fibrina, adesione di piastrine e neutrofili e riduzione della produzione dell'attivatore del plasminogeno, che porta alla formazione di un coagulo. Questo, induce la proliferazione delle SMCs che migrano dalla media all'intima, dove vanno ad accumularsi, e producono ECM fibrosa provocando l'ispessimento dell'intima, la fibrosi della media ed un complessivo irrigidimento del vaso, limitando la sua capacità di adattamento alla circolazione arteriosa. Ad un anno dall'intervento il graft può, infine essere colpito da fenomeni aterosclerotici, con formazione di placche di materiale lipidico, proteico e fibroso,

paragonabili a quelle che interessavano le coronarie native affette originariamente dalla patologia (Figura 1.16) [1, 21].

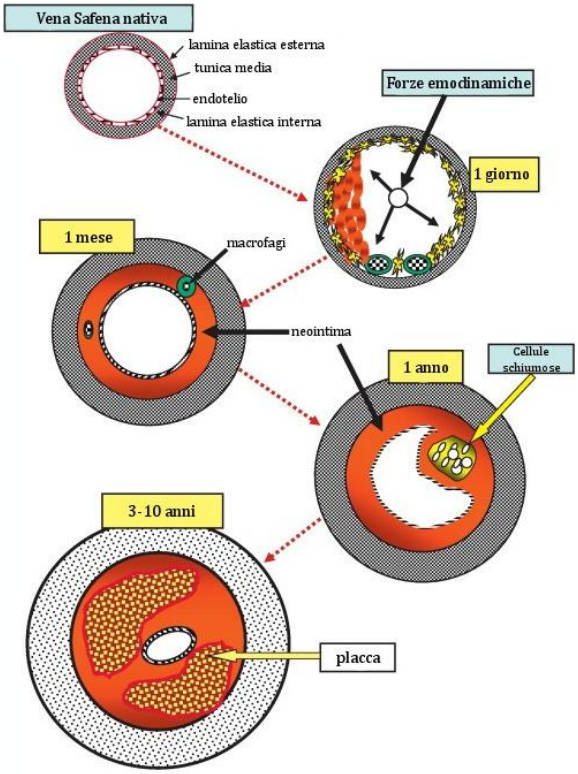


Figura 1.16 *Evoluzione temporale del VGD. Adattata da [22].*

L'esito finale di questa cascata di eventi è, nella quasi totalità dei casi, la stenosi del graft con conseguente necessità di sottoporre il paziente a reintervento.
I fattori di rischio per l'insorgenza del VGD sono gli stessi fattori di rischio della patologia coronarica a monte; tra questi citiamo il fumo, l'iperlipidemia, l'ipertensione e la presenza di patologie diabetiche. La sorveglianza su questi fattori riduce il rischio di sviluppo di VGD in soggetti sottoposti a CABG.

Inoltre, l'incidenza della trombosi nel periodo post-operatorio può essere ridotta mediante la somministrazione di una terapia anticoagulante e il processo aterosclerotico può essere attenuato mediante l'adozione di un corretto regime alimentare ed, eventualmente, attraverso una terapia farmacologica mirata [20].

Una tecnica innovativa di prelievo definita "*no-touch*" mira ad eliminare, invece, il danno provocato, in fase di *harvesting*, dalla distensione manuale della vena al suo endotelio, asportando la safena con il tessuto circostante, evitando, così, di rimuoverne la fonte nutritiva costituita dai *vasa vasorum* [23].

1.6 Conclusioni

Sebbene esistano strategie preventive ormai consolidate, focalizzate alla riduzione dei fattori di rischio, e strategie volte ad ovviare totalmente il problema dell'insorgenza del VGD, impiegando graft di tipo arterioso, la comprensione della patogenesi del VGD è oggetto continuo di ricerca. La vena safena presenta infatti numerosi vantaggi, tra cui la facilità di asportazione, la lunghezza adatta all'impiego in bypass multipli e il diametro molto simile al diametro delle coronarie, che la rendono il sostituto di elezione per gli interventi di rivascolarizzazione. Per questo motivo, è di grande interesse comprendere quali siano i fenomeni cellulari alla base del VGD, responsabili del fallimento del graft. A tale scopo si presenta la necessità di realizzare dei modelli che consentano di riprodurre, in maniera semplificata, le dinamiche che si realizzano *in vivo*. Dal punto di vista della riproduzione di un sistema complesso, governato da fattori chimico-fisici e soprattutto da stimoli di tipo meccanico, però, i modelli *in vitro* classici risultano eccessivamente riduttivi ed è, pertanto, stato necessario sviluppare sistemi *ex vivo*, più completi e, tuttavia privi dell'elevata variabilità caratteristica dei modelli *in vivo* su animale.

Nel secondo capitolo di questo elaborato sarà analizzato, quindi, lo stato dell'arte dei sistemi bioingegneristici realizzati fino ad oggi con lo scopo di mimare *ex vivo* ciò che avviene *in vivo* alla vena safena utilizzata come bypass aorto-coronarico. Lo scopo di questi lavori è, appunto, quello di riprodurre la sequenza di processi che conducono al VGD con l'obiettivo di giungere all'identificazione di strategie terapeutiche in grado di controllare l'aumento dello spessore della parete del graft. Sebbene esistano già numerosi potenziali trattamenti sperimentali che mostrano ottimi risultati su modelli animali, ad oggi nessuno di questi trattamenti è stato trasferito all'impiego clinico sull'uomo.

2.

Stato dell'arte

La riuscita degli interventi di bypass aorto-coronarico ottenuto mediante l'impiego di segmenti di vena safena autologa è fortemente influenzato dall'eventuale sviluppo di IH del graft venoso.

È ormai chiaro che sia la combinazione di fattori cellulari, fisici e umorali a determinare lo sviluppo del VGD; tuttavia, sebbene alcuni aspetti del processo siano stati chiariti, non è ancora stato raggiunto un livello di comprensione generale che tenga conto di tutti gli elementi in gioco. In particolare, è stata ormai dimostrata l'esistenza di un contributo delle cellule residenti del tessuto vascolare, delle cellule richiamate dal fenomeno infiammatorio e dei pattern intracellulari di *signaling* e attivazione; ciò che è ancora parzialmente sconosciuto è, invece, il ruolo svolto dalla biomeccanica nell'insorgenza del VGD.

Diversi gruppi di ricerca hanno, quindi, sviluppato sistemi di coltura d'organo in grado di riprodurre *ex-vivo* le condizioni in cui si trova la vena safena utilizzata come graft per bypass aorto-coronarici. L'obiettivo di questi studi è la comprensione degli effetti degli stimoli meccanici a cui la vena è soggetta sul fenomeno di arterializzazione e sull'insorgenza di IH e la valutazione *ex vivo* dell'efficacia di trattamenti farmacologici per inibire questa patologia.

2.1 Sistemi di coltura *ex vivo* per lo studio del fenomeno di arterializzazione

I sistemi di coltura *ex vivo* (*Ex Vivo Vessel Culture Systems* – EVCSs) consentono di riprodurre le condizioni a cui un organo o un tessuto sono sottoposti *in vivo*, con l'obiettivo di mantenere intatte la struttura e le funzioni dell'organo o del tessuto e, nel contempo,

indurne il normale sviluppo. Un vantaggio dell'approccio *ex vivo* è costituito dalla semplicità di interpretazione dei risultati in confronto, ad esempio, agli esperimenti *in vivo* su animale, in cui non è possibile controllare in modo indipendente le condizioni applicate e ragionare in termini di sovrapposizione di effetti.

Gli EVCSs si possono suddividere in due categorie (Figura 2.1): i sistemi di coltura statici, in cui i campioni biologici sono mantenuti senza essere sottoposti a forze meccaniche e i sistemi di coltura dinamici, che si basano sulla perfusione dei campioni vascolari con un flusso di tipo stazionario o pulsatile.

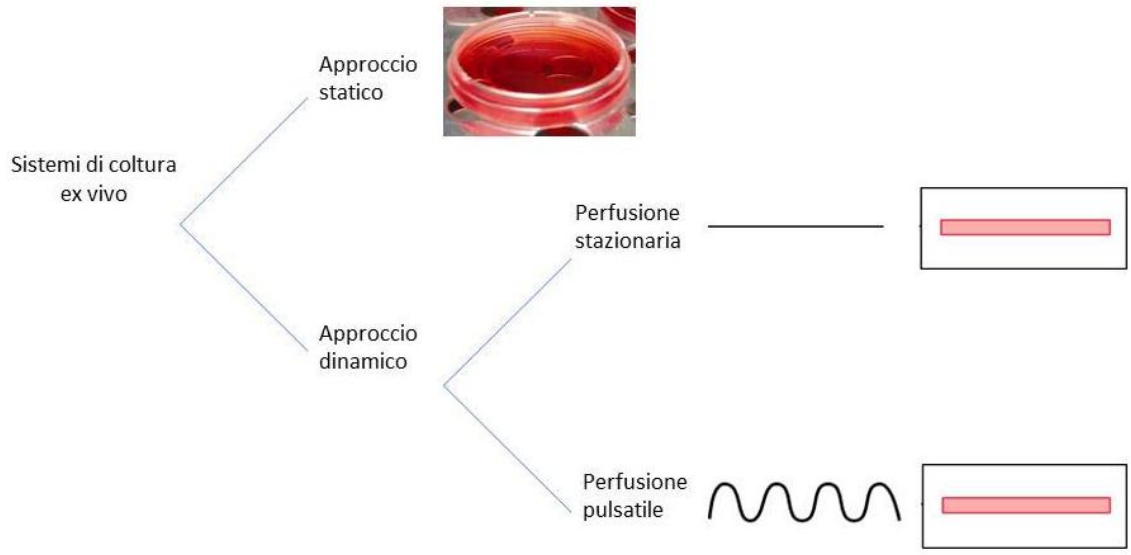


Figura 2.1 *Rappresentazione schematica degli approcci utilizzati nei sistemi di coltura ex vivo.*

2.1.1 Sistemi statici

I sistemi che rientrano sotto questa categoria non saranno trattati in modo dettagliato, in quanto un approccio di questo tipo non consente di riprodurre *ex vivo* le reali condizioni arteriose.

Tutti i lavori presenti in letteratura basati su questo approccio implicano il mantenimento in coltura di segmenti di vena safena, per un periodo di tempo variabile, mediante l'utilizzo di supporti e tecniche mutuati dalle colture cellulari. Saranno citati ora alcuni esempi di studi condotti con approccio di tipo statico, evidenziando le analisi condotte sui campioni al termine del periodo di coltura.

Nel 1990 Soyombo *et al.* [24] hanno pubblicato uno studio con lo scopo di stabilire se l'IH si verificasse in segmenti di vena safena sottoposti a coltura in condizioni statiche. Alla

fine del periodo di coltura, pari a 14 giorni, le analisi hanno mostrato la compresenza di EC e SMC nelle zone danneggiate. L'analisi di sezioni trasversali del tessuto, colorate per le fibre elastiche, ha mostrato, inoltre, lo sviluppo di neointima contenente cellule muscolari lisce, identificate mediante tecniche di immunoistochimica (colorazione α-SMA) (Figura 2.2); la marcatura con timidina triziata[1] ha mostrato cellule proliferanti nello strato neointimale, indicando che le SMC identificate derivavano sia da processi migratori che, appunto, proliferativi. I risultati del lavoro hanno confermato, dunque, l'ipotesi che i segmenti di vena safena mantenuti in coltura statica, mostrino fenomeni di proliferazione dell'intima.

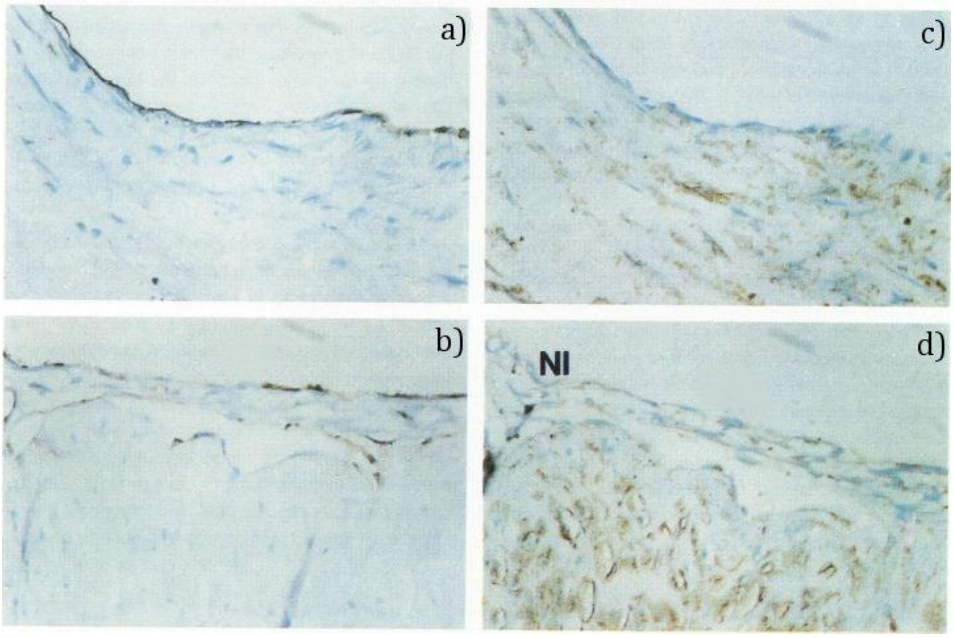


Figura 2.2 *Istologie di sezioni trasversali di vena safena, campioni di controllo (a e c) e campioni posti in coltura statica per 14 giorni (b e d). La colorazione per le EC (a e b) mostra la presenza di uno strato neointimale subendoteliale ad alta cellularità a 14 giorni. La colorazione per le SMC (c e d) mostra la presenza di questo tipo cellulare nella media e nella neointima (NI) a 14 giorni. Adattata da [24].*

Nello studio del 1996 di Porter *et al.* [25] sono state confrontate le modificazioni riscontrate nei segmenti di vena safena coltivati *in vitro* per 14 giorni con quelle riscontrate nei graft venosi patologici *in vivo*. Sezioni ottenute dai due gruppi sperimentali sono state sottoposte ad analisi istomorfologiche (colorazione per l'elastina), immunoistochimiche (colorazione α-SMA per l'actina delle SMC) e di microscopia elettronica a trasmissione (TEM), al fine di confrontarne le modificazioni subite. Alcune sezioni sono state, inoltre,

[1] La timidina triziata, [^{3}H]Timidina, viene incorporata nel DNA delle cellule in duplicazione, in modo equivalente alla timidina, la sua detezione da informazioni sul tasso di proliferazione cellulare.

utilizzate per stabilire quale fosse il più adatto tra i seguenti marcatori di proliferazione cellulare: timidina triziata, Ki67[2], PCNA[3] (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e 5-Bromodeossiuridina[4]. Sebbene le informazioni ricavate attraverso i marker descritti siano risultate confrontabili tra loro, nel lavoro è stato indicato come il miglior marker disponibile la 5-Bromodeossiuridina. Dalle analisi sono emerse forti similarità nella composizione della componente cellulare e dell'ECM ed, in entrambi i casi, una significativa presenza di SMC con fenotipo secretorio (Figura 2.3).

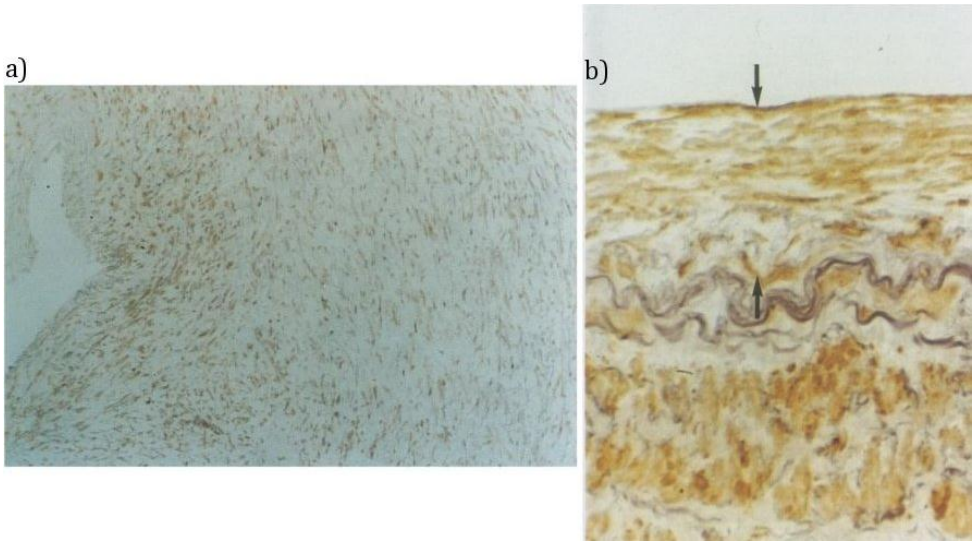


Figura 2.3 *Colorazione per l'elastina e per l'actina delle SMC su sezioni di graft venoso stenotico (a) e di vena posta in coltura (b). Si osserva un elevato numero di cellule colorate sia a livello della lesione stenotica che a livello della neointima (indicata tra le frecce in b). Adattata da [25].*

Nel lavoro del 2006 di Mekontso-Dessap [26], sono stati sottoposti a coltura e confrontati segmenti di vena safena, di arteria toracica interna e di arteria radiale, al fine di confrontare il grado di rimodellamento della parete nei tre tipi di vasi. Al termine della coltura è stato valutato l'aumento dello spessore dell'intima attraverso analisi istomorfologiche (colorazione per le fibre elastiche) e sono state confrontate le SMC estratte dai tre tipi di tessuto, in termini di proliferazione cellulare (marcatura con timidina triziata), migrazione (camera di Boyden modificata) e sintesi di collagene (marcatura con prolina triziata). Nei segmenti di vena safena è stato riscontrato un maggiore aumento dello spessore dell'intera parete e in particolare dell'intima (Figura 2.4), con elevato coinvolgimento e maggiore proliferazione e migrazione delle SMC. Gli autori hanno

[2] Il Ki67 è un anticorpo specifico per un antigene nucleare che viene esposto durante le fasi replicative del ciclo cellulare.
[3] La PCNA è una proteina coinvolta nella sintesi del DNA, rilevabile con tecniche immunologiche.
[4] La 5-Bromodeossiuridina (5-BrdU) è un analogo della timidina che viene incorporato nel DNA delle cellule in proliferazione e che viene poi localizzato mediante un anticorpo monoclonale.

ipotizzato, quindi, che il differente comportamento *ex vivo* delle SMC appartenenti alle tre tipologie di vasi possa essere alla base del loro diverso comportamento a lungo termine nelle applicazioni di rivascolarizzazione.

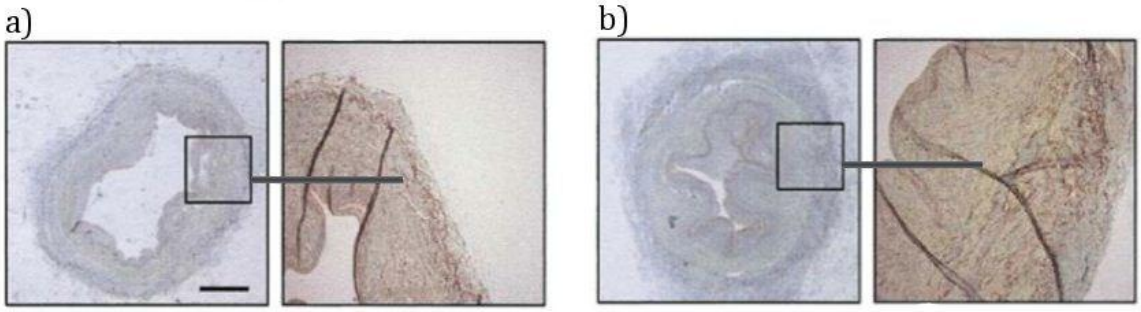


Figura 2.4 *Colorazione per le fibre elastiche su sezioni di segmenti di vena safena di controllo (a) e mantenute in coltura per 10 giorni (b). Si osservano le differenze nella struttura e nello spessore della parete. Adattata da [26].*

Nel lavoro del 2007 di Schachner e collaboratori [27] è stata verificata l'ipotesi che il trattamento con *paclitaxel*, un farmaco inibitore mitotico usato in chemioterapia, possa ridurre lo sviluppo di iperplasia ed essere quindi una potenziale via di prevenzione del VGD. Segmenti di vena safena sono stati incubati per 14 giorni in medium o in medium con aggiunta di concentrazioni crescenti del farmaco. I campioni sono stati, quindi, sottoposti ad analisi istomorfologiche (ematossilina-eosina H/E, colorazione tricromica di Masson e colorazione per le fibre elastiche) ed immunoistochimiche (anti-αSMA, per colorare l'actina delle SMC, desmina, marcatore di proliferazione Ki67). I risultati hanno mostrano un significativo effetto inibitorio del *paclitaxel* sullo sviluppo di iperplasia, indipendentemente dalla concentrazione della molecola (Figura 2.5). Gli autori hanno concluso, quindi, indicando il *paclitaxel* come un potenziale farmaco per la prevenzione del VGD.

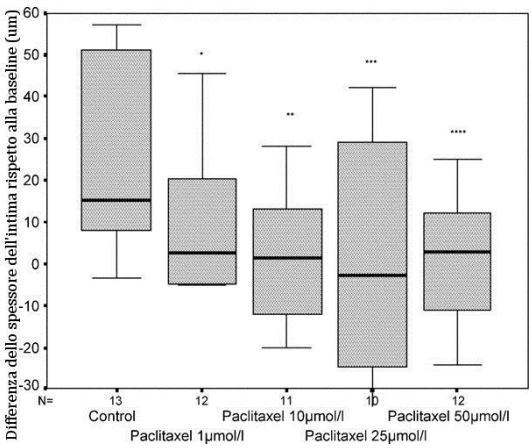


Figura 2.5 *Crescita della neointima in campioni di vena safena sottoposti a coltura per 14 giorni rispetto alla vena nativa (controllo) al variare della concentrazione di Paclitaxel. Adattata da [27].*

Nel 2011, nel lavoro pubblicato da Joddar *et al.* [28], è stato valutato il ruolo di alcune specie reattive contenenti ossigeno nel processo di *signaling* caratteristico dei primi stadi di evoluzione del VGD ed è stato esplorato il potenziale terapeutico del *Protandim*, un integratore alimentare capace di incrementare la produzione di enzimi antiossidanti endogeni. Alcuni campioni di vena safena umana sono stati esposti al *Protandim* per 14 giorni, altri lasciati come controllo per lo stesso lasso di tempo. Dall'analisi dei risultati è emerso che il trattamento con *Protandim* blocca sia l'IH che l'ispessimento della tunica media (Figura 2.6) così come l'aumento della proliferazione cellulare, agendo sulla quantità e sull'azione della catalasi (un enzima antiossidante endogeno). Gli autori hanno concluso, quindi, indicando il *Protandim* come possibile candidato per futuri trattamenti farmacologici a prevenzione del VGD.

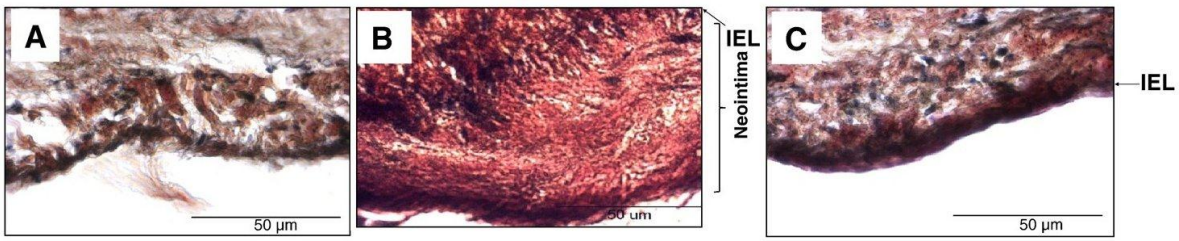


Figura 2.6 *Colorazione di Van Gieson per l'elastina su sezioni di vena safena di controllo (a), mantenute in coltura senza Protandim (b) e mantenute in coltura con Protandim (c). In b si osserva lo sviluppo significativo di iperplasia dell'intima al di sotto della lamina elastica interna (IEL) mentre in c non si osserva questo fenomeno. Adattata da [28].*

Dall'analisi dei sistemi statici si osserva che segmenti di vena safena mantenuti in coltura per tempi dell'ordine di 10-14 giorni, senza essere sottoposti a stimolazione, vanno rapidamente incontro a rimodellamento di tipo patologico, anche in assenza di segnali biochimici aterogenici; questo fenomeno può essere motivato, almeno in parte, dalla totale assenza di sollecitazioni meccaniche fisiologiche [29].

2.1.2 Sistemi dinamici

I sistemi dinamici consentono di sottoporre segmenti di vena safena a condizioni fluidodinamiche definite e controllate e sono quindi progettati con l'obiettivo di riprodurre, nel modo più fedele possibile, le condizioni fisiologiche. Le componenti costitutive dei sistemi dinamici di *organ colture* presenti in letteratura sono molto simili; in generale sono sempre presenti una camera di coltura, in cui viene alloggiato il campione biologico, un attuatore, con lo scopo di generare lo stimolo desiderato, una camera di riserva per il

medium di coltura (*reservoir*), una camera di *compliance*, collocata a valle dell'attuatore, uno scambiatore di gas e la circuiteria necessaria a connettere i vari elementi. Spesso sono presenti anche trasduttori di pressione e flussimetri; infine, in alcuni casi sono presenti sistemi di monitoraggio e controllo gestiti da un PC. In Figura 2.7 è riportata una rappresentazione schematica della struttura generale dei sistemi di perfusione dinamici.

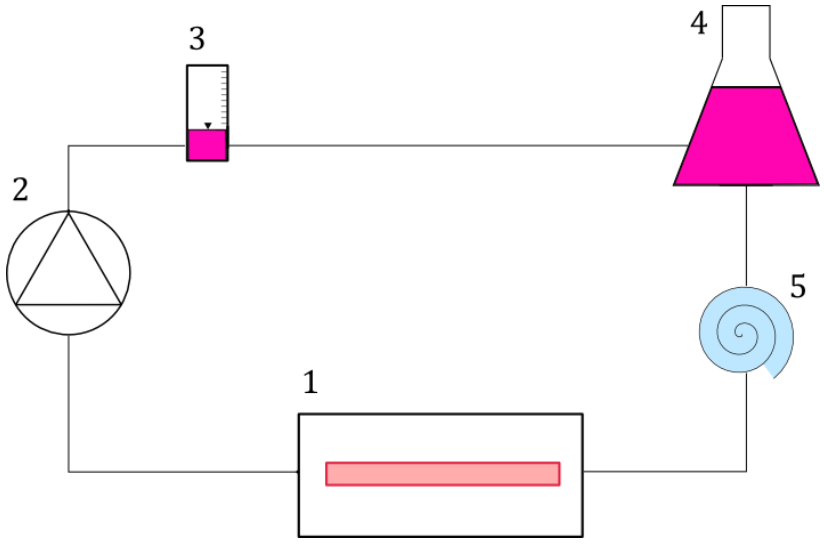


Figura 2.7 *Rappresentazione schematica generale dei sistemi di perfusione. Si distinguono la camera per l'alloggiamento del vaso (1), l'attuatore (2), la camera di compliance (3), il reservoir (4) e lo scambiatore di gas (5).*

Nella descrizione che segue, ci soffermeremo a descrivere l'architettura dei sistemi di stimolazione solo nei casi in cui questa si discosti molto da quella generale appena delineata.

2.1.2.1 Sistemi a perfusione stazionaria

Uno dei primi sistemi a perfusione è stato realizzato da Porter e collaboratori nel 1996 [30]; il sistema "*flow rig*" è stato realizzato con lo scopo di esaminare gli effetti di condizioni di flusso differenti su molteplici segmenti di vena safena provenienti dallo stesso paziente. Il sistema, Figura 2.8, consta di due circuiti: uno caratterizzato da valori venosi di portata, pressione e *shear stress*, il secondo caratterizzato da dinamiche di tipo arterioso.

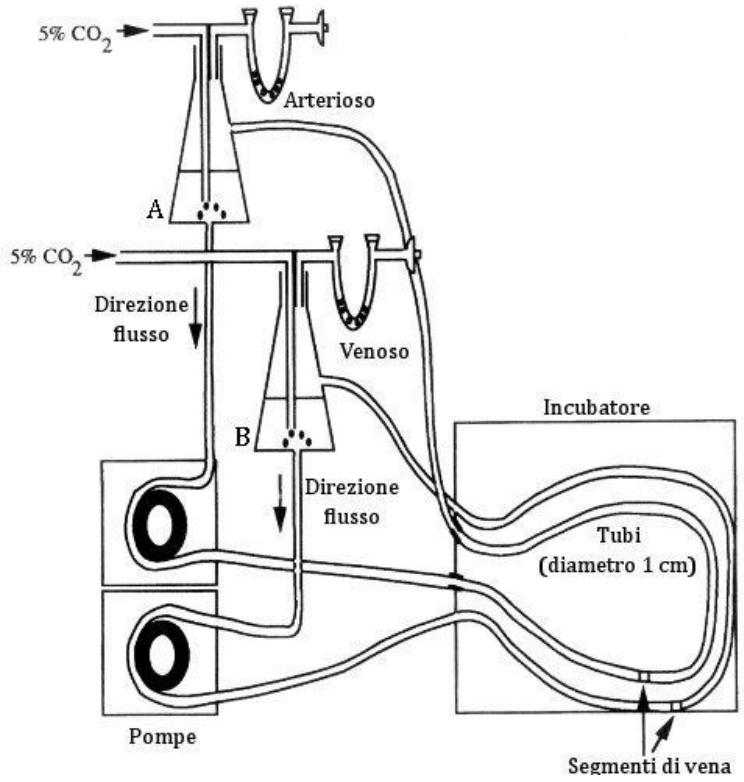


Figura 2.8 *Rappresentazione schematica del sistema flow rig. Si distinguono i due circuiti distinti di stimolazione, venosa e arteriosa; ogni circuito è caratterizzato dalla presenza di una pompa, un reservoir e circuito idraulico dedicato costituito da tubi in silicone di diametro pari a 1 cm. Adattata da [30].*

Le diverse condizioni fluidodinamiche sono state ottenute modulando l'altezza relativa della flask utilizzata come *reservoir* (A e B in Figura 2.8) e il numero di giri della pompa. Da ogni vena sono stati ottenuti segmenti di lunghezza pari a 5 mm, che sono stati fissati, mediante appositi spilli, all'interno dei tubi in silicone del circuito e posti in coltura in incubatore a 37°C per 13 giorni. Per ogni vena due campioni sono stati sottoposti a condizioni venose (Q=70 ml/min, P=15 mmHg, τ=0.1 Pa), due campioni a condizioni arteriose (Q=500 ml/min, P=85 mmHg, τ=0.9 Pa) e due campioni sono stati utilizzati come controllo in condizioni statiche.

Al termine del periodo di coltura le analisi immunoistochimiche (colorazione αSMA per l'α-actina delle SMC e colorazione di Millers per le fibre elastiche) hanno mostrato, nei campioni mantenuti in coltura statica uno sviluppo significativo di neointima (20 μm), nei campioni sottoposti a condizioni venose lo sviluppo di uno strato neointimale più sottile (8 μm) e nei campioni sottoposti a condizioni arteriose la totale mancanza di sviluppo di neointima (Figura 2.9). Dall'analisi dei risultati, gli autori suggeriscono l'esistenza di un controllo sull'attività delle SMC, operato dalle EC, al variare dello *shear stress*.

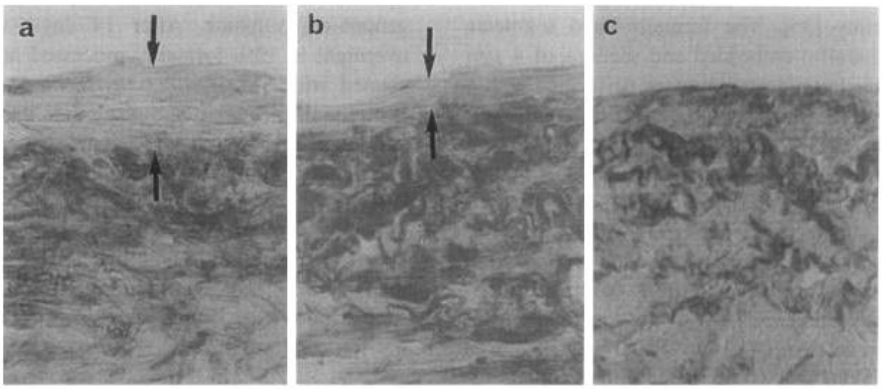


Figura 2.9 *Colorazione αSMA/Millers su sezioni trasversali di vena safena dopo 14 giorni di coltura in condizioni (a) statiche, (b) venose e (c) arteriose. Le frecce indicano lo strato di neointima sviluppato durante la coltura. Adattata da [30].*

Nel 2000, Surowiec e collaboratori [31] hanno realizzato un sistema di perfusione (Figura 2.10) in cui poter alloggiare tratti di vena safena umana di lunghezze significativamente maggiori rispetto a quelle consentite dal sistema di Porter.

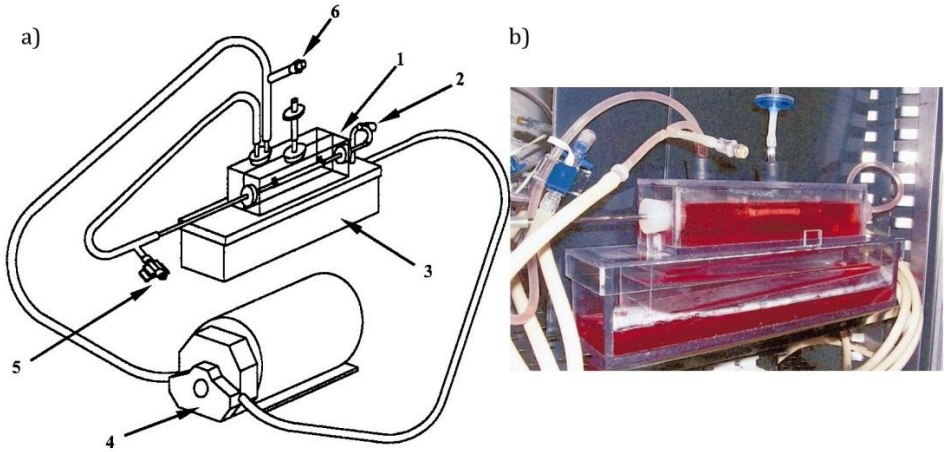


Figura 2.10 a) S*chema del sistema di coltura composto da: camera di alloggiamento del vaso unita alla camera di compliance (1), valvola pinzatubo per l'incremento manuale della pressione intraluminale (2), camera per l'ossigenazione del medium (3), pompa peristaltica (4), trasduttore di pressione (5), port per l'iniezione di farmaci (6). b) immagine del sistema in esercizio. Adattata da [31].*

Uno dei maggiori vantaggi di questo sistema è rappresentato dalla possibilità di alloggiare segmenti di vaso di lunghezza variabile all'interno del range 3-10 cm. Segmenti di vena safena, di lunghezza media pari a 5 cm, sono stati perfusi, con portata pari a 100 ml/min, per 24, 48, 72 e 96 ore; un segmento è stato conservato come controllo statico. Sui campioni in coltura sono state condotte prove di contrazione e rilassamento, al fine di verificarne il mantenimento della vitalità. I risultati hanno mostrato l'assenza di differenze statisticamente significative nelle proprietà meccaniche dei vasi, fino a 4 giorni di coltura. La scelta di effettuare queste prove durante la coltura ha comportato la necessità di

mantenere la pressione intraluminale inferiore a 40 mmHg, valore sopra il quale la deformazione circonferenziale, indotta dalle sostanze vasoattive somministrate, non sarebbe stata apprezzabile. Le analisi istologiche (Figura 2.11), hanno mostrato l'assenza di danni all'endotelio fino a 4 giorni di coltura (colorazione H/E e marcatura per fattore di vW[5]) e la presenza di cellule in proliferazione all'interno dello strato endoteliale (saggio Bromodeossiuridina).

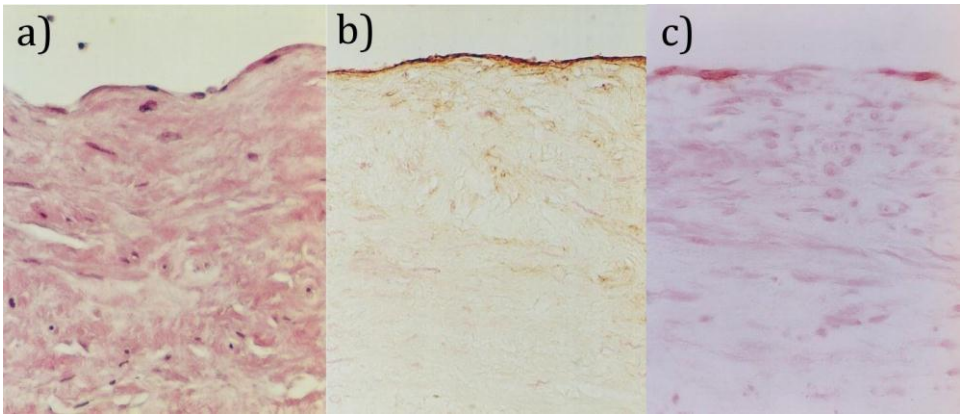


Figura 2.11 *Colorazione H/E (a), colorazione per fattore di vW (b) e saggio di proliferazione Bromodeossiuridina (c) su sezioni di vena safena umana dopo 24 ore di coltura. Adattata da [31].*

Nel lavoro del 2001 di Patterson [32], è stato impiegato un sistema a perfusione con l'obiettivo di verificare la presenza di una relazione tra lo *shear stress*, l'attività delle metalloproteasi (MMP) e l'ispessimento dell'intima, in segmenti di vena safena umana mantenuti in coltura per 7 giorni. In Figura 2.12 è riportata un'immagine della camera di coltura in cui è alloggiato un segmento di vena safena.

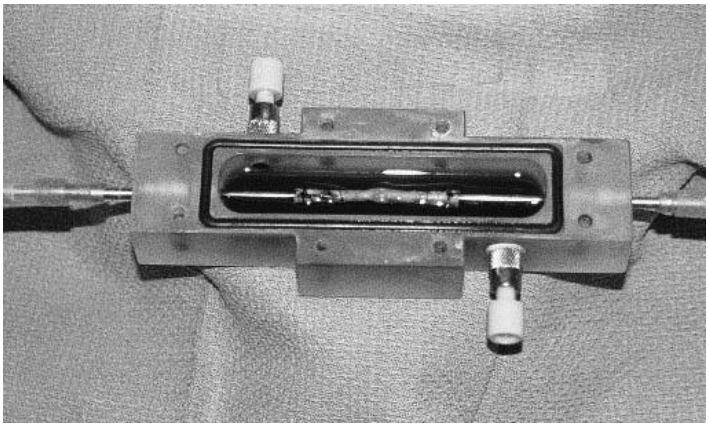


Figura 2.12 *Camera di coltura in cui è alloggiata una vena. Il coperchio non è presente.*

[5] Fattore di Von Willebrand, un marcatore per le cellule endoteliali.

Da ogni vena safena, ottenuta da interventi di CABG, sono stati ricavati quattro campioni di cui, uno è stato tenuto come controllo, uno è stato posto in coltura statica e due sono stati perfusi rispettivamente con alte (*shear stress* elevato: 0.9/1.2 Pa) e basse (*shear stress* ridotto: 0.2-0.4 Pa) portate di fluido; in entrambe le condizioni la pressione è stata mantenuta costante a 50 mmHg. Al termine dei 7 giorni di coltura i campioni sono stati sottoposti a zimografia[6] e saggio ELISA[7], per la quantificazione dell'attività e della concentrazione delle MMP, e ad analisi istologiche (colorazione tricromica di Masson) per la valutazione morfologica dell'intima. Per quanto riguarda le MMP, l'analisi dei risultati ha mostrato l'esistenza di un legame tra l'aumento dello *shear stress* e l'espressione e l'attività delle MMP (Figura 2.13). In particolare, per alti livelli di *shear stress*, in condizioni cioè paragonabili a quelle arteriose, si è osservato un significativo aumento nell'espressione delle metalloproteasi MMP-2 e MMP-9 e degli inibitori delle metalloproteasi TIMP-1 e TIMP-2; in queste condizioni sperimentali si è osservato, inoltre, un aumento dell'attività proteolitica della MMP-2, mentre l'aumento di attività della MMP-9 è stato controbilanciato dall'attività del suo inibitore TIMP-1.

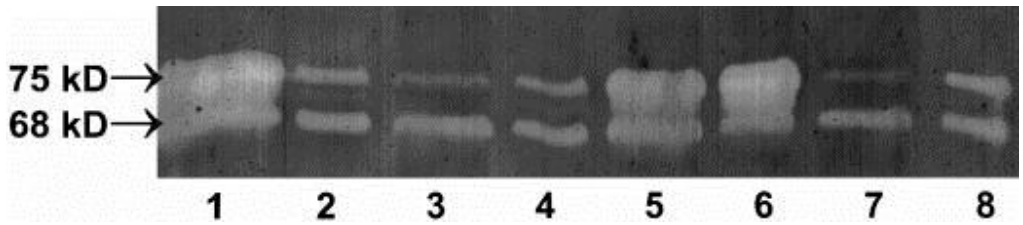


Figura 2.13 *Zimogramma rappresentativo delle proteine espresse: 1) controllo positivo MMP-2, 2) campione di controllo del tessuto, 3 e 4) campioni sottoposti a bassi valori di portata, 5 e 6) campioni sottoposti ad alti valori di portata, 7e 8) campioni mantenuti in coltura statica. Si osserva l'aumento di espressione nel caso di portata, e quindi shear stress, elevati.*

Infine, le analisi istologiche hanno mostrato un significativo aumento dello spessore dell'intima nei campioni sottoposti a *shear stress* elevato (Figura 2.14), a conferma della presenza di un legame tra *shear stress*, espressione e attivazione delle metalloproteasi, ed aumento dello spessore dell'intima.

[6] La zimografia è una tecnica elettroforetica basata su SDS-PAGE che permette la visualizzazione del numero e del peso molecolare approssimativo delle proteasi in un campione.
[7] Il saggio ELISA consente di rilevare e quantificare la presenza di antigeni in un campione grazie ad anticorpi specifici legati ad enzimi in grado di convertire un substrato in un precipitato colorato quantificabile fotometricamente.

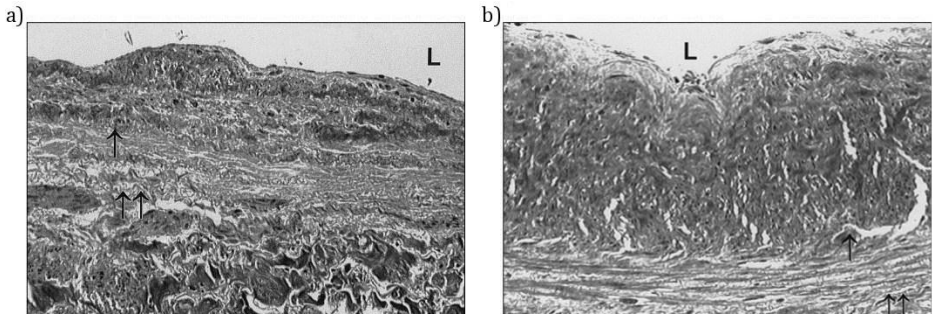


Figura 2.14 *Colorazione tricromica di Masson su sezioni di vena safena sottoposta a flusso basso (a) e flusso elevato (b) per 7 giorni. Si nota il marcato ispessimento dell'intima al di sopra della lamina elastica interna (freccia singola); le doppie frecce indicano la lamina elastica esterna. Adattata da [32].*

Nel lavoro di Rey [33] del 2004 è stato esaminato l'effetto di una perfusione a basso *shear stress* sulla risposta biologica di segmenti di vena safena umana, in particolare dello strato endoteliale e delle SMC e confrontato con l'effetto della coltura statica su diversi segmenti dello stesso vaso. In particolare, per la generazione delle condizioni di flusso desiderate gli autori si sono avvalsi del sistema EVVSS (*Ex Vivo Vein Support System*), da loro realizzato (Figura 2.15). Dalle vene sono stati ricavati tre campioni: uno come controllo a tempo zero, uno destinato alla coltura statica, il terzo destinato ad essere perfuso (τ=0.2-0.6 Pa) per 14 giorni. Al termine della coltura è stata valutata la risposta vasomotoria nei vari gruppi; non sono emerse differenze tra i campioni perfusi ed i rispettivi controlli ad indicare il mantenimento della contrattilità delle SMC. L'integrità della parete del vaso è stata determinata mediante colorazione con H/E; le cellule si sono mostrate vitali nei campioni appartenenti al gruppo perfuso, statico e di controllo.

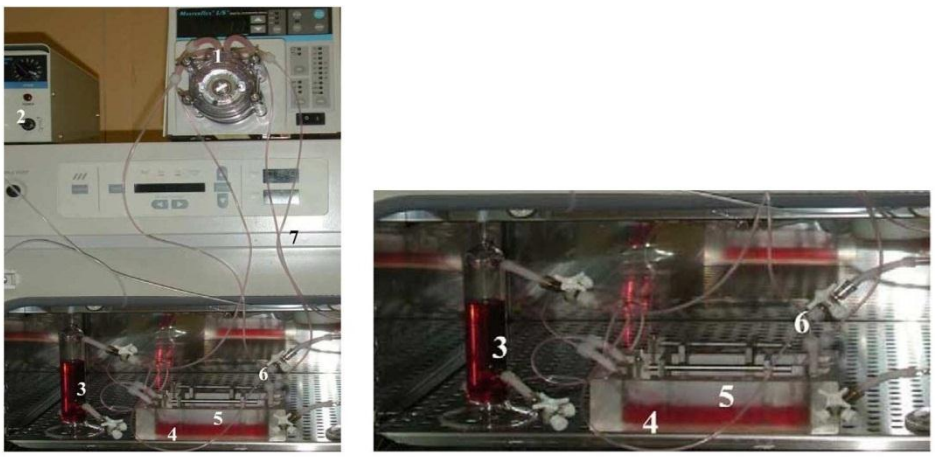


Figura 2.15 *Fotografia del sistema EVVSS (a sinistra) composto da: pompa peristaltica (1), sensore di pressione (2), reservoir (3), camera di perfusione (4), vena (5), flussimetro (6), circuito idraulico in silicone (7). A destra zoom della camera di coltura. Adattata da [33].*

Analisi morfometriche dello spessore degli strati intimale e sotto-intimale hanno rivelato un aumento, pari in media a circa 10 μm, dello spessore del vaso perfuso rispetto al controllo a tempo zero; tuttavia, non sono emerse differenze significative dell'aumento dello spessore intimale tra i campioni perfusi e quelli mantenuti in coltura statica (Figura 2.16c). Sui campioni sono state, inoltre, condotte analisi immunoistochimiche (anticorpi: CD31, CD34, fattore di vW, α-SMA) che, nel complesso, hanno mostrato l'integrità dello strato endoteliale e delle SMC. Infine, da analisi *northern blot* è stato osservato il significativo aumento dell'espressione dell'mRNA dell'inibitore PAI-1[8] nei due gruppi trattati rispetto al controllo, questo indica la presenza di possibili fenomeni migratori delle SMC. Da questo studio è emerso che i campioni mantenuti in coltura statica e quelli sottoposti a perfusione subiscono uno sviluppo paragonabile di IH; gli autori suggeriscono come motivazione di questo fenomeno l'assenza di pulsatilità del flusso e di valori di *shear stress* sufficientemente elevati.

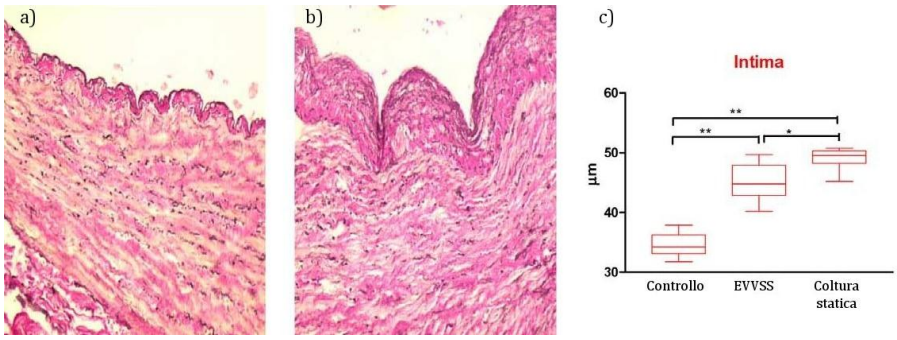


Figura 2.16 *Colorazione H/E su sezioni del vaso a tempo zero (a) e dopo 14 giorni di coltura nell'EVVSS (b); si nota lo sviluppo di neointima in b. Variazioni nello spessore dell'intima tra i tre gruppi sperimentali (controllo, perfuso con EVVSS, coltura statica) (c): * = p>0.05, ** = p<0.05. Adattata da [33].*

Nel 2008 Miyakawa e collaboratori [34] hanno sviluppato un sistema di perfusione *ex vivo* (Figura 2.17) che consente di riprodurre le condizioni fluidodinamiche arteriose e venose su segmenti di vena safena di lunghezza pari a 2 cm per periodi tempo di 1, 2 o 4 giorni. Segmenti di vena safena, provenienti dallo stesso soggetto, sono stati coltivati per 1, 2 o 4 giorni in condizioni venose (Q=5 ml/min) e arteriose (Q=50 ml/min, P=80 mmHg); da ogni vaso è stato ricavato anche un campione di controllo. La colorazione con H/E ha mostrato una diminuzione del numero di nuclei cellulari passando da 1 a 4 giorni di

[8] PAI-1 è ritenuto il più importante tra gli inibitori degli attivatori del plasminogeno, l'inattivazione del gene che lo codifica comporta lo sviluppo di una notevole iperplasia dell'intima.

stimolazione arteriosa; nelle vene mantenute in condizioni venose, invece, non è stata osservata alcuna alterazione.

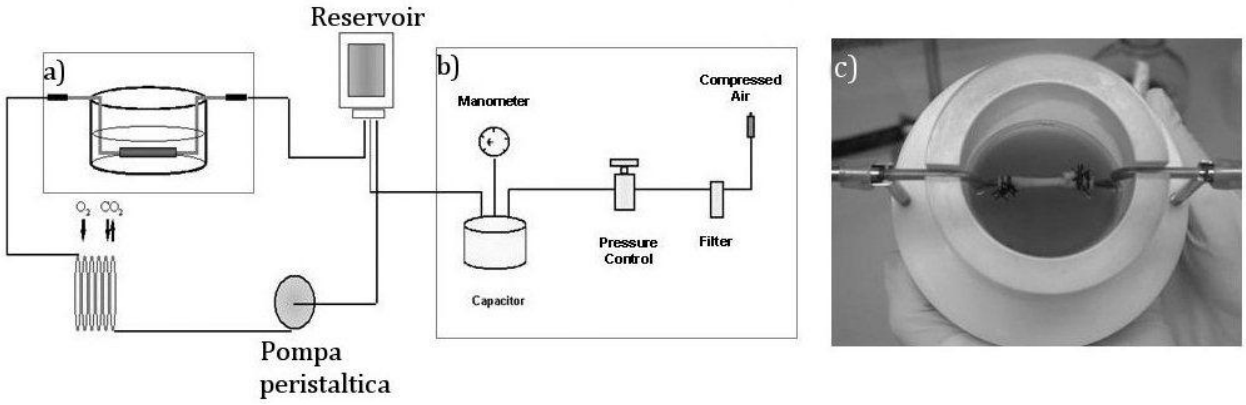


Figura 2.17 *Sistema di perfusione; rappresentazione schematica del sistema composto dalla camera di coltura (a), dal reservoir, dalla pompa peristaltica e dall'apparato per il controllo della pressione (b); in (c) è riportato uno zoom della camera di coltura. Adattata da [34].*

Anche la colorazione dei nuclei con Hoechst 33258 ha confermato questo risultato, mostrando la diminuzione della densità cellulare in condizioni arteriose, dopo 4 giorni di coltura (Figura 2.18a). I saggi MTT[9] per la vitalità cellulare, e TUNEL[10] per l'apoptosi cellulare, hanno mostrato, per quanto riguarda i segmenti mantenuti in condizioni venose, una buona vitalità cellulare e la scarsa presenza di cellule apoptotiche. Per quanto riguarda il gruppo sperimentale arterioso, invece, è stata osservata la presenza di poche cellule vitali e una significativa presenza di cellule in apoptosi (Figura 2.18b).

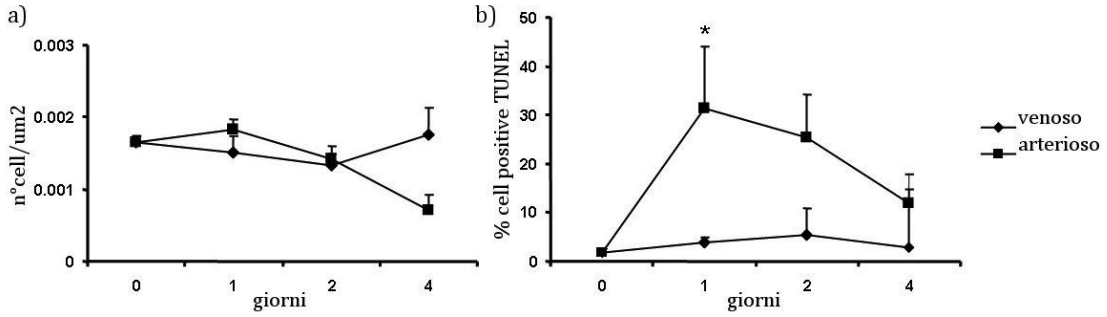


Figura 2.18 *Risultati delle analisi di densità cellulare al variare delle condizioni di perfusione (a) e risultati del saggio TUNEL al variare delle condizioni di perfusione (b). Adattata da [34].*

[9] Il saggio MTT è un saggio colorimetrico standard per la misurazione dell'attività di enzimi che sono tipicamente attivi solo nelle cellule vitali; fornisce quindi indicazioni sulla vitalità cellulare.
[10] Il saggio TUNEL consente l'individuazione delle cellule in apoptosi mediante colorazione delle estremità dei frammenti del DNA delle cellule in questa condizione.

L'assenza di fenomeni proliferativi nei campioni sottoposti a condizioni arteriose non è chiara agli autori, essi hanno ipotizzano che possa dipendere dall'assenza di fattori di crescita specifici nel medium utilizzato o che possa essere determinata dal tempo di coltura ridotto.

Nel lavoro pubblicato da Liao *et al.* [35] nel 2008 è stato impiegato un sistema di coltura a perfusione (Figura 2.19) per studiare il comportamento di quattro gruppi sperimentali di arterie carotidi porcine, poste in coltura per 24, 48, 72 e 96 ore. I gruppi sperimentali sono stati così strutturati: arterie normali (24, 48, 72, 96 ore), arterie con endotelio danneggiato (24, 48, 72, 96 ore), arterie danneggiate coltivate con FGF2 (*fibroblast growth factor*) (96 ore), arterie danneggiate coltivate con FGF2 coniugato a SAP (*cytotoxin saporin*) (96 ore). La perfusione è stata condotta con valori di portata e pressione, mantenuti costanti a 100 ml/min e 100 mmHg, rispettivamente.

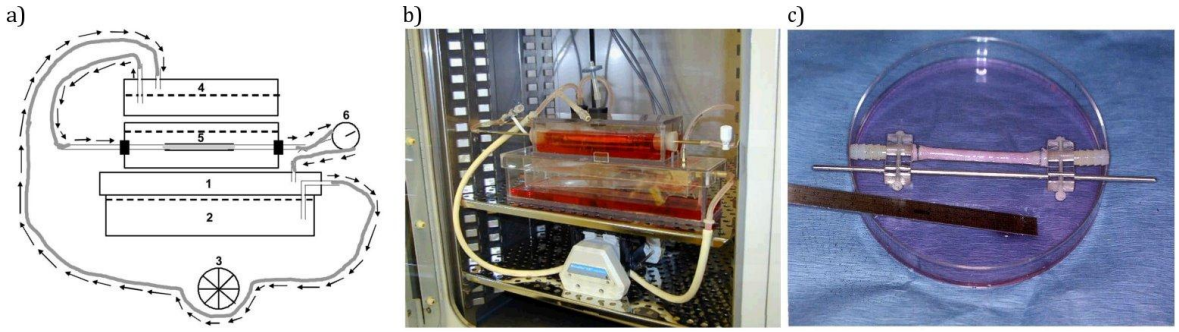


Figura 2.19 *Schema del sistema di perfusione (a): scambiatore di gas (1), camera di perfusione (2), pompa (3), camera di compliance (4), camera di coltura (5), flussimetro (6). Foto del sistema in esercizio all'interno di un incubatore (b). Foto del sistema di afferraggio del vaso (c). Adattata da [35].*

Al termine del periodo di coltura stabilito è stata valutata la risposta vasomotoria e sono state eseguite analisi immunoistochimiche con Bromodeossiuridina, α-SMA e fattore vW. Le prove di attività vasomotoria hanno confermato il mantenimento della vitalità cellulare fino a 96 ore di coltura, con una leggera diminuzione nel tempo. Le analisi immunoistochimiche hanno mostrato una percentuale di proliferazione delle SMC crescente col tempo di coltura e maggiore nello strato più interno della tunica media. Le arterie con endotelio danneggiato hanno mostrato valori significativamente maggiori di proliferazione a tutti i time-point (Figura 2.20). Infine, la proliferazione delle SMC è risultata influenzata dalla presenza del fattore di crescita FGF2, mentre la presenza della coniugazione FGF2-SAP l'ha inibita.

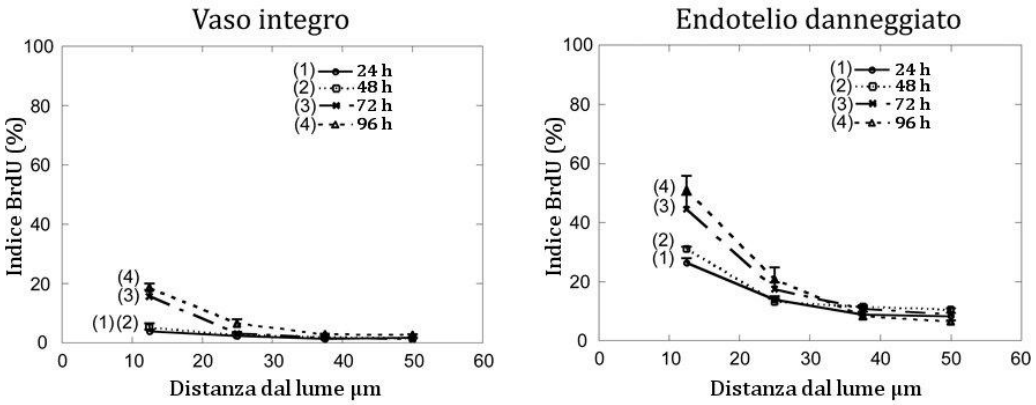


Figura 2.20 *Proliferazione delle SMC nelle arterie carotidi porcine integre (a sinistra) e con endotelio danneggiato (a destra) al variare del tempo di coltura. Adattata da [35].*

L'obiettivo del lavoro pubblicato da Hoenicka [36] nel 2010 è stato quello di valutare il consumo di ossigeno e glucosio di tratti di vena safena bovina in condizioni diverse di stimolazione, al fine di applicare i risultati della ricerca al campo dell'ingegneria dei tessuti per la produzione di vasi di piccolo calibro. Il sistema di coltura utilizzato è mostrato in Figura 2.21. Per gli esperimenti sono stati utilizzati campioni di vena safena bovina di lunghezza pari a 8 cm. Sono stati costituiti alcuni gruppi sperimentali (Tabella 2.1) per determinare l'influenza dello *shear stress*, della pressione e dell'integrità dell'endotelio sulle richieste metaboliche del vaso.

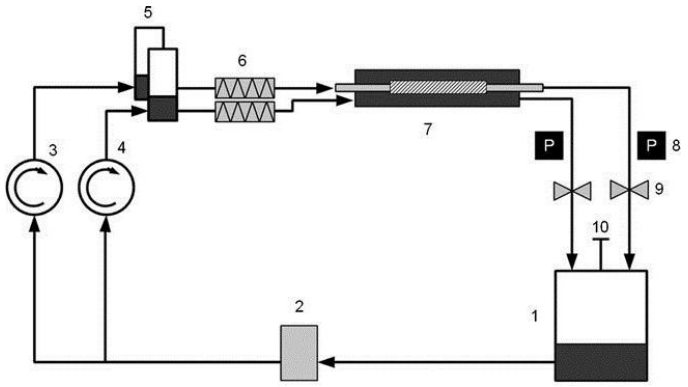


Figura 2.21 *Schema del sistema di perfusione: reservoir (1), ossigenatore (2), pompe (3-4), camere di compliance (5), scambiatori di calore (6), camera di coltura (7), trasduttori di pressione (8), resistori di Starling (9), filtro HEPA per la ventilazione del reservoir (10).*

In particolare, ad alcuni gruppi è stato applicato un livello fisiologico venoso di *shear stress* (0.05-0.22 Pa) mediante l'aggiunta di destrano nel medium per aumentare la viscosità del fluido; ad alcuni gruppi è stata applicata una pressione costante di circa 20 mmHg; alcuni

campioni biologici sono stati manipolati prima della coltura al fine di danneggiarne l'endotelio; infine, i campioni di un gruppo sono stati perfusi con portata pari a 60 ml/min contro i 40 ml/min degli altri gruppi. Tutti i gruppi sono stati mantenuti in coltura per 4 giorni, ad eccezione di un gruppo in cui la coltura è stata protratta fino a 8 giorni. In Tabella 2.1 sono riassunti i parametri a cui sono stati sottoposti i campioni appartenenti ai vari gruppi sperimentali.

	1	1'	2	3	1-d	2-d	3-d	1-a	2-a	3-a
N	16	8	5	8	5	5	5	4	4	4
Destrano	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Pressione	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
Durata (giorni)	4	8	4	4	4	4	4	4	4	4
Danno endoteliale	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Portata (ml/min)	40	40	40	40	40	40	40	60	60	60

Tabella 2.1 *Composizione dei gruppi sperimentali. Il gruppo 1 rappresenta il controllo, per il gruppo 1' la durata dell'esperimento è stata protratta fino a otto giorni, il gruppo 2 è stato perfuso in presenza di destrano, al gruppo 3 è stata applicata una pressione costante, i gruppi –d sono stati perfusi in seguito a danno endoteliale, i gruppi –a sono stati perfusi a portate maggiori. Adattata da [36].*

Durante la coltura sono state prelevate aliquote di medium per la quantificazione del consumo di ossigeno e di nutrienti; al termine della coltura è stata valutata la risposta vasomotoria e la vitalità cellulare dei campioni con saggio MTT. Sono state inoltre svolte analisi istologiche con colorazione H/E, fattore di vW e per l'E-selectina[11]. La colorazione con H/E non ha mostrato significative variazioni morfologiche nella tunica media e nell'avventizia, mentre, nella tunica intima, si è osservata una perdita di EC dopo 4 giorni di coltura. In presenza di destrano l'endotelio si mostrava intatto, sebbene con una diminuzione della densità cellulare. Indipendentemente dai valori pressori applicati non sono state osservate variazioni del mantenimento dell'integrità endoteliale. Il gruppo di campioni mantenuto in coltura per 8 giorni ha, invece, mostrato la completa perdita delle EC e segni di disgregazione dello strato sub-endoteliale. Il significativo aumento di E-selectina prima e dopo la coltura in presenza di destrano suggerisce l'esistenza di una risposta indotta dallo *shear stress*. Il danneggiamento dell'endotelio ha portato al riscontro di diffusi fenomeni apoptotici nella zona luminale dei vasi in tutte le condizioni

[11] L'E-selectina è una molecola adesiva espressa solamente dalle EC attivate dalle citochine; svolge un ruolo importante nei fenomeni infiammatori.

sperimentali. Infine, la perfusione a portate maggiori ha comportato la perdita dell'endotelio in 4 giorni di coltura. Infine, per valutare gli effetti della coltura a portate elevate sul metabolismo del vaso è stata misurata la concentrazione di glucosio e di lattato; i dati hanno mostrato l'avvenuta fermentazione del lattato, ad indicare la presenza di un legame tra *shear stress* e consumo alterato di glucosio da parte dei campioni biologici.

2.1.2.2 Sistemi a perfusione pulsatile

Nel 1996, Golledge [37] ha pubblicato un lavoro in cui è descritto un modello *ex vivo* per lo studio della risposta adattativa dell'endotelio della vena safena sottoposta a condizioni arteriose. Il sistema utilizzato è mostrato in Figura 2.22.

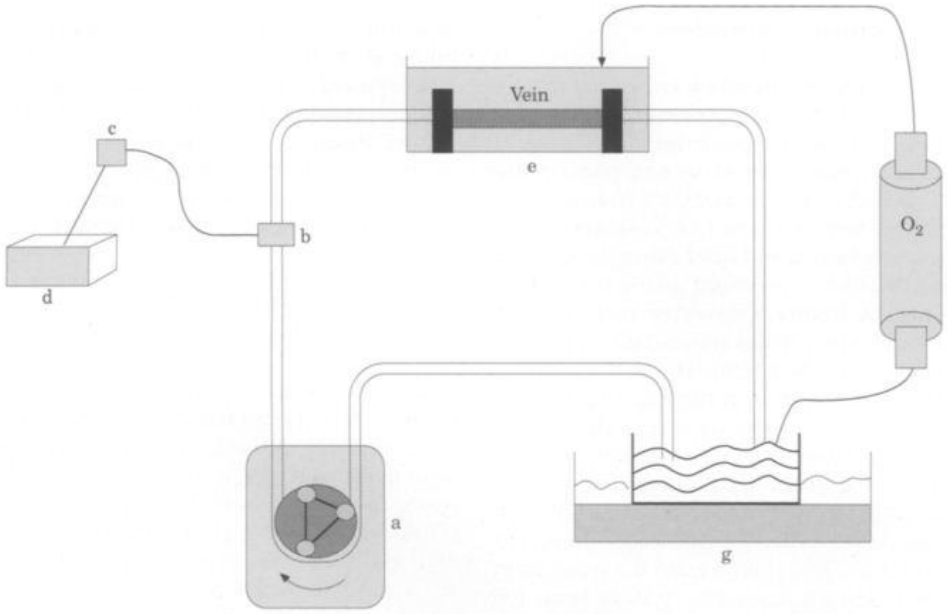


Figura 2.22 *Schema del sistema di coltura ex vivo: pompa (a), rubinetto a tre vie (b), trasduttore di pressione (c), lettore del trasduttore (d), camera di alloggiamento del vaso (e), ossigenatore (f), reservoir all'interno del bagnetto a 37°C (g).*

I campioni di vena sono stati sottoposti a flusso pulsatile con portata media pari a 200 ml/min e valori pressori medi di 100 mmHg (condizioni arteriose), o a flusso non pulsatile con portata pari a 40 ml/min e pressione pari a 20 mmHg (condizioni venose) per 90 minuti. In alcuni casi, i campioni sottoposti a condizioni arteriose sono stati montati all'interno di uno stent in PTFE (politetrafluoroetilene), per limitarne la deformazione in direzione circonferenziale. I risultati delle prove di risposta vasomotoria e la concentrazione di ATP hanno confermato la vitalità dei campioni al termine dell'esperimento. Analisi immunoistochimiche, basate sulla detezione del marcatore CD31,

hanno mostrato l'integrità dell'endotelio e, sui campioni sottoposti a condizioni arteriose, hanno evidenziato una leggera perdita endoteliale, pari al 5-10%. Analisi dell'espressione di ICAM-1, una proteina coinvolta nell'adesione dei leucociti, hanno mostrato valori raddoppiati dell'espressione di questa proteina nei campioni sottoposti a flussi arteriosi; nei campioni sottoposti a condizioni arteriose, ma dove la deformazione circonferenziale era limitata dalla presenza dello stent, non si sono osservate variazioni.

Il sistema di perfusione pulsatile realizzato da Labadie [38] nel 1996 consentiva di sottoporre segmenti intatti di tessuto vascolare a un ambiente caratterizzato da emodinamica fisiologica. Il sistema HRS (Hemodynamic Replication System) (Figura 2.23), grazie alla presenza di una valvola a saracinesca controllata via software, consente la creazione di un'onda pressoria simile a quella arteriosa.

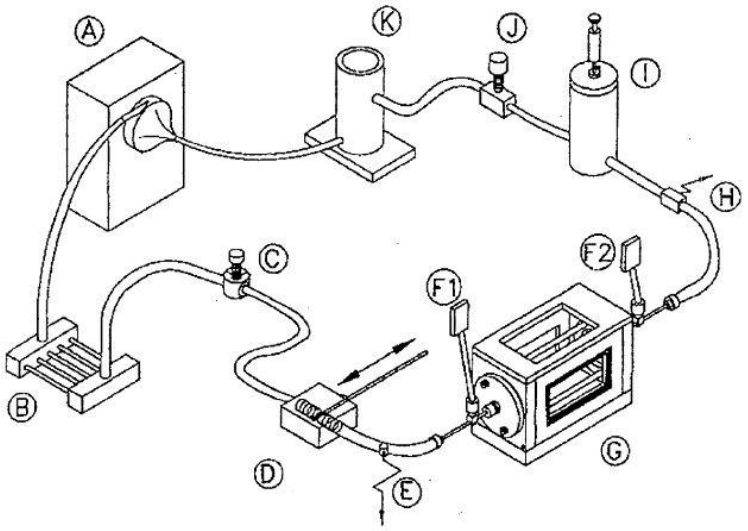


Figura 2.23 *Schema del sistema di perfusione: pompa centrifuga (A), scambiatore di calore (B), regolatore di pressione (C), valvola a saracinesca (D), sensore di temperatura (E), trasduttori di pressione (F1-F2), camera di coltura del vaso (G), flussimetro (H), camera di compliance (I), valvola (J), reservoir (K).*

La camera di coltura (Figura 2.24) è stata concepita per alloggiare segmenti di lunghezza variabile tra 2 e 15 cm.

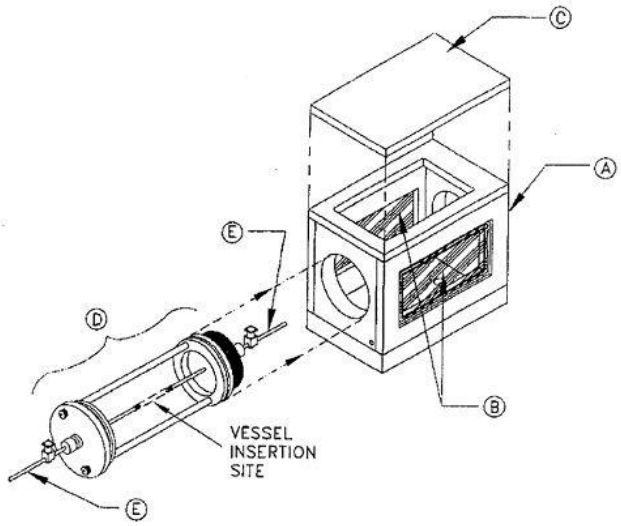


Figura 2.24 *Disegno della camera di coltura del vaso: il vaso è suturato su cannule in acciaio inossidabile (E), integrate nel supporto rimovibile di montaggio (D), il supporto rimovibile si inserisce in una struttura ermetica (A), datata di pannelli in vetro (B) e di coperchio rimovibile (C).*

Gli esperimenti sono stati condotti su vene safene umane, ricavate da interventi di CABG; i vasi sono stati perfusi con condizioni emodinamiche arteriose, pressione compresa tra 80 e 120 mmHg e portata media di 100 ml/min, per 24 ore. I campioni sono stati, quindi, analizzati al microscopio confocale, in seguito a colorazione con falloidina legata a rodamina per visualizzare l'actina filamentosa, e al TEM. Le analisi hanno mostrato la presenza di un endotelio continuo e intatto su tutta la superficie intraluminale sovrapposto al tessuto connettivo e allo strato di SMC. È stata osservata, inoltre, una normale distribuzione di eucromatina ed eterocromatina nei nuclei delle SMC ad indicare la vitalità di tali cellule.

Il setup utilizzato da Conklin [39] nel 2000 rappresenta un'evoluzione del sistema a perfusione stazionaria realizzato da Surowiec [31]; grazie alle modifiche apportate, il sistema consente di simulare l'emodinamica fisiologica delle coronarie e sottoporre i campioni biologici a flusso pulsatile (Figura 2.25). Ciò che caratterizza la nuova versione del sistema è la presenza del simulatore di flusso fisiologico (PFS - Physiological Flow Simulator) e di una seconda camera di *compliance* posta distalmente rispetto al vaso (Figura 2.26). La funzione del PFS è di aggiungere una componente pulsatile al flusso continuo generato dalla pompa: la seconda *compliance*, invece, permette di controllare la differenza di pressione tra la fase "sistolica" e la "diastolica".

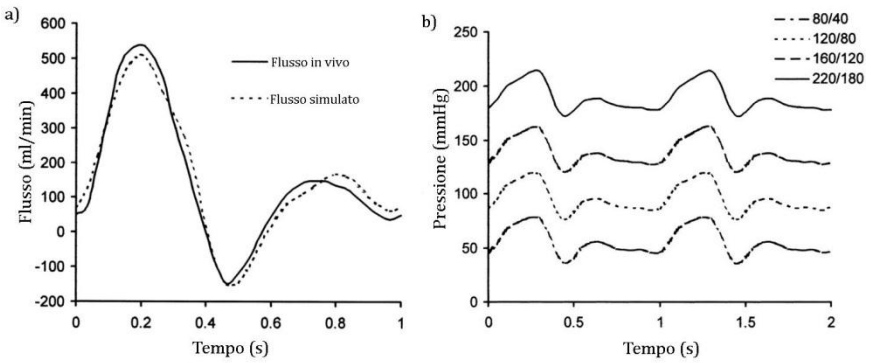


Figura 2.25 *Andamenti di flusso e pressione generati dal PFS. In a si osserva l'andamento del flusso reale e simulato relativo all'arteria femorale canina, in b si osserva l'andamento pulsatile della pressione simulata dal PFS al variare dei valori massimi e minimi. Adattata da [39].*

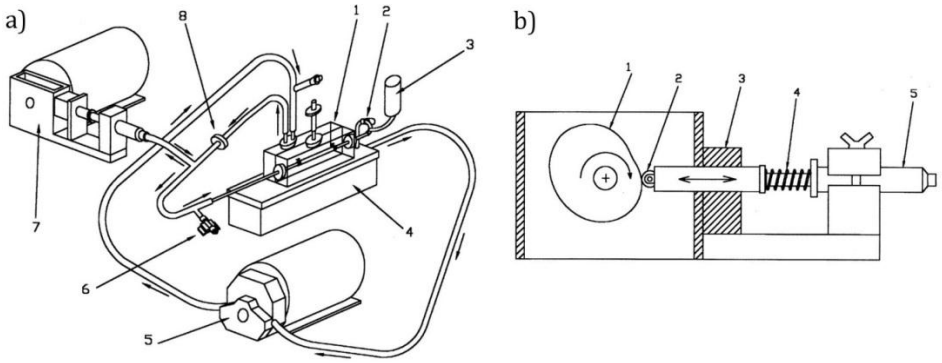


Figura 2.26 *Schema del sistema di coltura completo (a): camera di compliance e camera di coltura (1), valvola (2), camera di compliance distale (3), scambiatore di gas (4), pompa (5), trasduttore di pressione (6), PFS (7), valvola di non ritorno (8). Schema del PFS (b).*

Il sistema è stato utilizzato per stimolare arterie carotidi porcine sottoposte a flusso stazionario (Q=140 ml/min, P=100 mmHg) o a flusso pulsatile (Q_{media}=170 ml/min, P=80-120 mmHg) per 24 ore. Le analisi istologiche (colorazione H/E) condotte sui campioni hanno mostrato la presenza di uno strato endoteliale integro, il mantenimento della morfologia da parte delle SMC e l'assenza di modificazioni significative a carico dell'ECM (Figura 2.27).

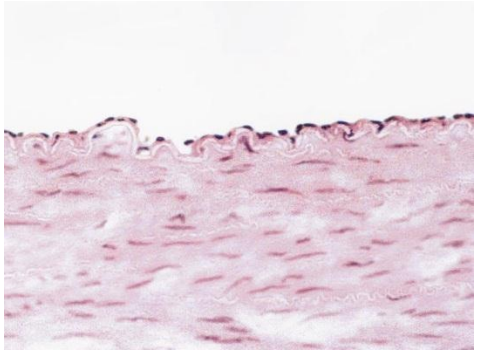


Figura 2.27 *Colorazione H/E su campione perfuso: si nota un monostrato di EC a confluenza, una lamina elastica interna integra, SMC dall'aspetto normale e con orientamento circonferenziale e una normale ECM.*

Nel 2005 Gusic [40] ha pubblicato uno studio basato sull'uso del sistema di coltura protetto da brevetto (No: US 7,011,623 B2 del 14 marzo 2006), (Figura 2.28) già impiegato dal collega Clerin [29] per stabilire un ambiente emodinamico semplificato come punto di partenza per il successivo sviluppo di progetti di *tissue engineering* per vasi di piccolo calibro. L'obiettivo del lavoro di Gusic è stato quello di discriminare gli effetti di pressione e *shear stress* sul rimodellamento di vene safene porcine sottoposte a differenti condizioni emodinamiche per 7 giorni. Le condizioni sperimentali applicate sono state cinque: venose (Q=10 ml/min, P=25 mmHg), portate elevate (Q=40 ml/min, P=25 mmHg), incremento pressorio (Q=10 ml/min, P incrementata linearmente da 25 a 75 mmHg in 7 giorni), *shear stress* controllato (*shear stress* costante di 1 Pa), condizioni di bypass (Q=85 ml/min, P_{media}=80 mmHg, pulsatilità, viscosità del medium aumentata con destrano a 4 cP).

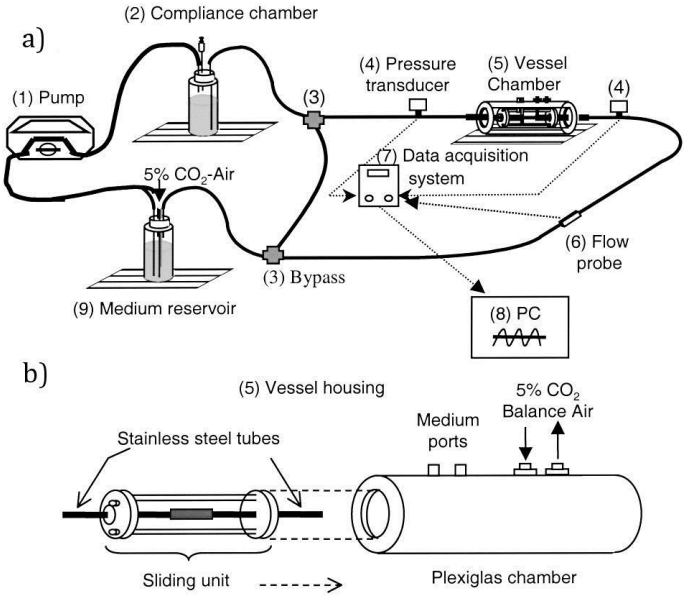


Figura 2.28 *Schema del sistema di coltura (a): pompa (1), camera di compliance (2), bypass in cui eventualmente deviare il flusso (3), trasduttore di pressione (4), camera di alloggiamento del vaso (5), flussimetro (6), sistema di acquisizione dati (7), computer (8), reservoir/scambiatore di gas (9). Camera di alloggiamento del vaso (b): i vasi sono incannulati a due cilindri in acciaio inossidabile e l'assemblato è inserito in una camera in PMMA, i port sulla camera permettono lo scambio di gas e di medium.*

Al termine del periodo di coltura tutti i campioni perfusi si sono mostrati intatti e pervi; la colorazione per le fibre elastiche ha mostrato una tunica media in buono stato e confrontabile con quella dei vasi nativi e la formazione di neointima, in grado variabile in base alle condizioni di perfusione (Figura 2.29). Tutti i campioni sottoposti a perfusione hanno mostrato una riduzione dell'area luminale rispetto al vaso nativo (Figura 2.29A). È stato osservato inoltre un andamento decrescente del rapporto tra l'area dell'intima e

l'area della media all'aumentare dello *shear stress*; nei campioni sottoposti a condizioni venose (Figura 2.29B) e a rampa di pressione (Figura 2.29D) è stato osservato il maggiore aumento di spessore. Per quanto riguarda i campioni sottoposti a flusso elevato (Figura 2.29C) e a *shear stress* costante pari a 1 Pa (Figura 2.29E) questo fenomeno è stato meno significativo. I campioni di controllo, mantenuti in coltura statica (Figura 2.29F), hanno mostrato distruzione dell'intima; i campioni sottoposti a condizioni venose sono risultati positivi al marcatore α-actina per le SMCs, mentre, per quanto riguarda i campioni sottoposti a condizioni di bypass gli effetti sull'intima sono stati vari, con zone simili al vaso nativo (Figura 2.30a), zone di distruzione della lamina elastica, zone caratterizzate da iperplasia (Figura 2.30b) e altre da denudazione endoteliale (Figura 2.30c).

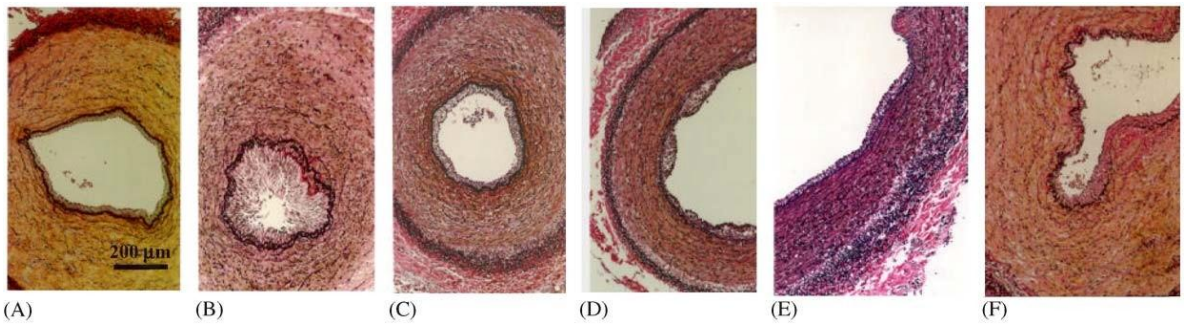


Figura 2.29 *Colorazione per le fibre elastiche su sezioni di campioni nativi (A), perfusi in condizioni venose (Q=10 ml/min, P=25 mmHg) (B), perfusi con flusso elevato (Q=40 ml/min, P=25 mmHg) (C), perfusi con aumento a rampa della pressione (Q=10 ml/min, P=25-75 mmHg) (D), perfusi con shear stress costante (1 Pa) (E), mantenuti in coltura statica (F).*

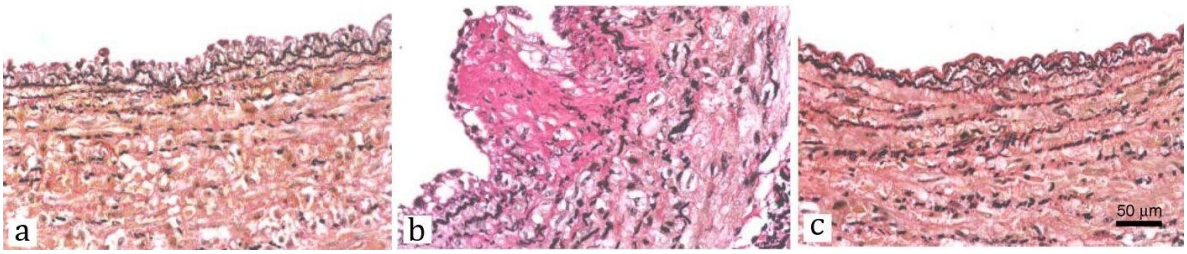


Figura 2.30 *Colorazione per le fibre elastiche su sezioni di campioni perfusi in condizioni di bypass (Q_{media}=85 ml/min, P_{media}=80 mmHg). Si notano aree con endotelio intatto (a), aree con iperplasia dell'intima (b), aree con denudazione endoteliale (c). Adattata da [40].*

Tutti i campioni perfusi, inoltre, hanno mostrato un elevato livello di proliferazione cellulare (marcatura con anti-PCNA) nelle tuniche avventizia, media e intima, e un basso livello di apoptosi cellulare (saggio TUNEL). Le vene sottoposte a flusso elevato hanno mostrato maggiore integrità dell'endotelio (colorazione per fattore vW). In generale, si è osservato che la pulsatilità pressoria non è stata uno stimolo necessario per la crescita

della tunica media, in quanto questo fenomeno si è verificato anche sotto le altre condizioni di perfusione. Gli autori hanno concluso, quindi, affermando che pressione e *shear stress* agiscono in modo indipendente sul rimodellamento vascolare.

Nel lavoro di Saucy [4] del 2010 è stata descritta e utilizzata l'evoluzione del sistema EVVSS già descritto nel lavoro di Rey [33]; questo sistema è stato modificato al fine di generare una perfusione di tipo pulsatile, controllata mediante PC (Figura 2.31).

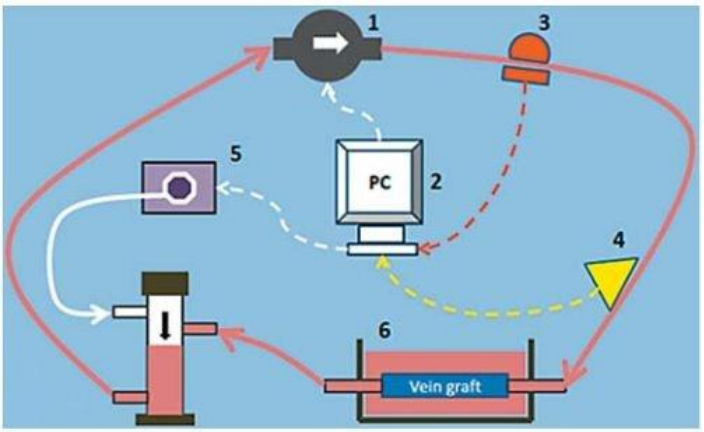


Figura 2.31 *Schema del sistema di coltura ex vivo: pompa (1), computer (2), sensore di pressione (3), flussimetro (4), controllore dell'attuatore che impone la pressione (5), camera di coltura (6).*

Gli esperimenti sono stati condotti su segmenti di vena safena umana derivanti da interventi di bypass agli arti inferiori; da ogni vena sono stati ottenuti tre campioni, uno conservato per il controllo statico e due sottoposti a perfusione per 7 e 14 giorni. Sono state imposte condizioni di tipo arterioso e cioè elevati valori di *shear stress* (0.9-1.5 Pa), flusso pulsatile (frequenza 1 Hz) con portata media di 120 ml/min, e pressione sistolica-diastolica di 80-40 mmHg. Dall'analisi della risposta vasomotoria non è emersa differenza significativa tra i campioni di controllo e i perfusi; questo conferma il mantenimento della contrattilità delle SMC dopo 14 giorni di coltura. La presenza delle SMC è stata inoltre confermata, in tutti i gruppi sperimentali, dalla colorazione α-SMA. Analisi immunoistochimiche per il marcatore delle EC CD31 hanno mostrato il mantenimento di uno strato di EC durante l'intero periodo di coltura (Figura 2.32). Colorazioni per Ki-67 (Figura 2.33) hanno mostrato l'assenza di fenomeni proliferativi nei campioni di controllo, mentre, per quanto riguarda i campioni perfusi con flusso pulsatile, questi fenomeni sono molto evidenti nello strato intimale, con un indice di proliferazione di circa 8.2%.

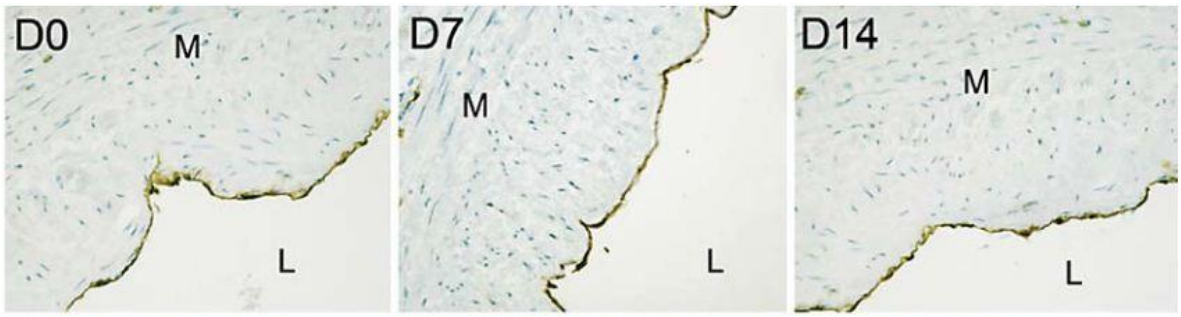


Figura 2.32 *Colorazione per CD31: si nota la presenza di uno strato di EC nel campione di controllo (D0), nel campione perfuso per 7 giorni (D7) e nel campione perfuso per 14 giorni (D14). Adattata da [4].*

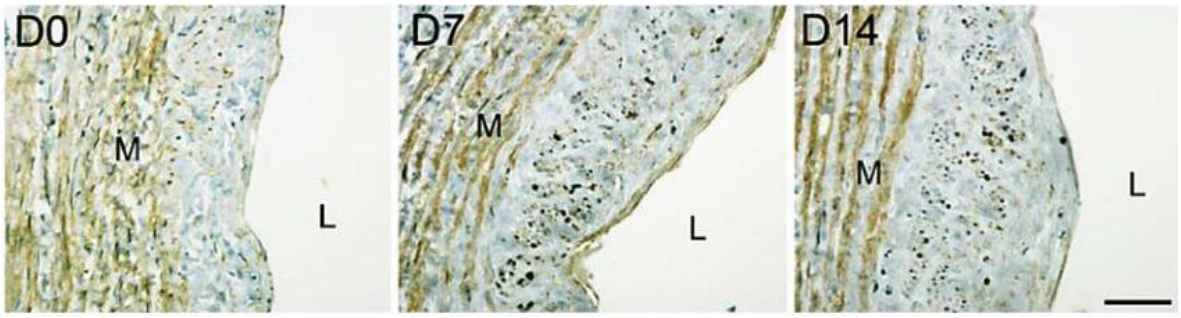


Figura 2.33 *Colorazione per Ki-67: a 7 (D7) e a 14 (D14) giorni di coltura si nota la presenza di cellule in proliferazione, assenti nel campione di controllo (D0). Adattata da [4].*

Analisi morfologiche hanno mostrato, infine, una significativa diminuzione dello spessore della media nei campioni perfusi rispetto ai campioni di controllo e una formazione di neointima paragonabile tra i due gruppi perfusi e aumentata rispetto al controllo (Figura 2.34).

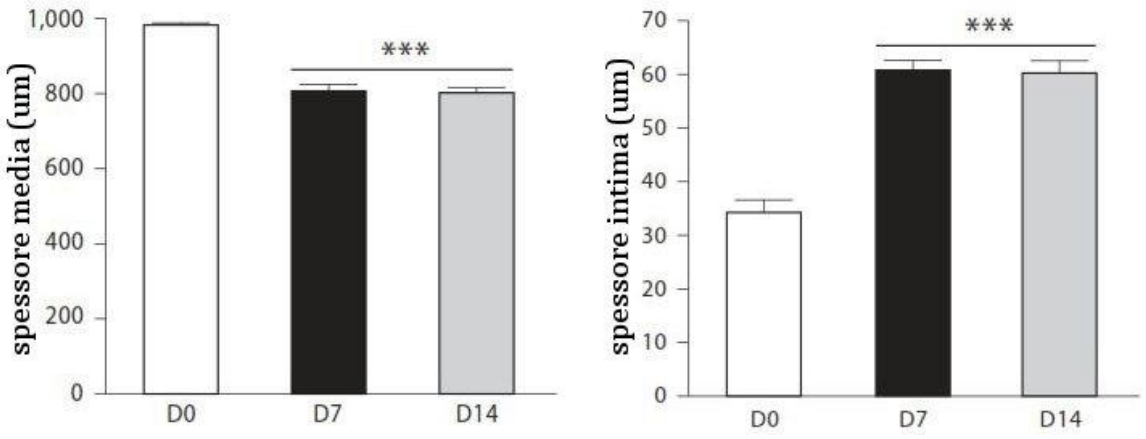


Figura 2.34 *Spessore della media e dell'intima a tempo zero (D0), dopo 7 giorni di coltura (D7) e dopo 14 giorni (D14). *** indica p<0.001 rispetto al controllo. Adattata da [4].*

In uno studio del 2012, condotto da Berard *et al.* [6], è stato nuovamente utilizzato il sistema EVVSS appena descritto. Gli esperimenti sono stati condotti su due gruppi sperimentali di campioni di vena safena umana; entrambi i gruppi sono stati sottoposti, per 7 giorni, a condizioni arteriose, in termini di portata pulsatile e *shear stress*, ma con valori pressori diversi: il primo gruppo con valori sistole-diastole di 8-6 mmHg, il secondo con valori di 90-65 mmHg. Le analisi morfometriche (Figura 2.35), realizzate con colorazione H/E e di Van Gieson, hanno mostrato nei campioni sottoposti a portata arteriosa con regimi pressori maggiori la formazione significativa di neointima rispetto al controllo, nonostante l'assenza di variazioni nello spessore della media. Nei campioni sottoposti a bassi valori pressori non è stata osservata la formazione di iperplasia dell'intima.

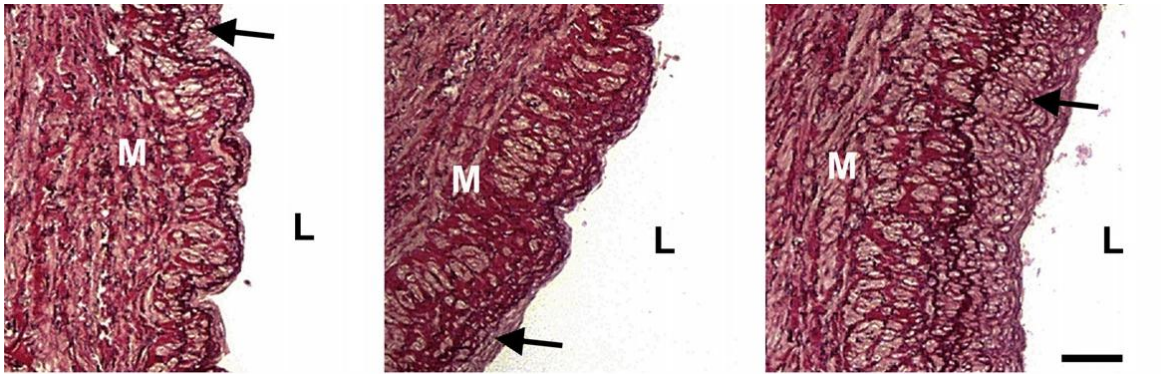


Figura 2.35 *Colorazione di Van Gieson su sezioni di vena safena native (a sinistra), sottoposte a shear stress arteriosi e bassi regimi pressori (al centro), e sottoposte a shear stress e regimi pressori più elevati (a destra). Si nota la presenza di neointima nell'ultimo campione, assente negli altri casi. M indica lo strato della media e L il lume. Adattata da [6].*

La colorazione H/E ha mostrato inoltre la presenza di un normale strato di EC lungo il lume di tutti i campioni ed una anormale presenza di SMC nelle zone di iperplasia. Colorazioni immunoistochimiche con anticorpi per il fattore di vW e per α-actina hanno mostrato la corretta presenza di EC nel versante luminale e di SMC nella media, in tutte le condizioni sperimentali. Infine, analisi immunoistochimiche per Ki-67 (Figura 2.36) hanno rivelato una marcata presenza di cellule proliferanti nella neointima dei campioni sottoposti a regimi pressori maggiori. Inoltre, l'esposizione a valori arteriosi di *shear stress* e a valori bassi di pressione ha portato all'aumento in termini di trascrizione, sintesi e attività della MMP-2, della MMP-9 e dell'inibitore TIMP-1; nel gruppo perfuso a pressioni più elevate questo aumento è stato maggiore e ha riguardato anche TIMP-2.

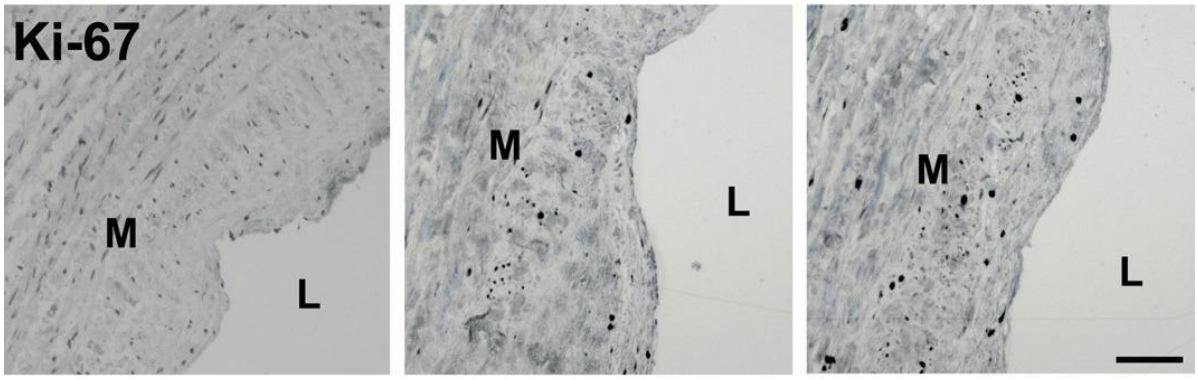


Figura 2.36 Colorazione per Ki-67 *su sezioni di vena safena native (a sinistra), sottoposte a portata arteriosa e bassi regimi pressori (al centro), e sottoposte a portata e regimi pressori arteriosi (a destra). Si nota la presenza di un numero maggiore di cellule marcate nell'ultimo campione. Adattata da [6].*

Il dispositivo di *organ culture* realizzato da Voisard [5], il *pp-venous HOC-model*, consente di fissare in parallelo più tratti di vena safena all'interno della camera di coltura e, grazie ad un sistema ad anello chiuso costituito da tubi elastici di diametri differenti, di mimare l'effetto Windkessel dell'albero arterioso. Una pompa ed un generatore di impulsi connessi in serie consentono di ottenere un flusso pulsatile. Campioni di vena safena umana sono stati sottoposti per 7 giorni a pressione pulsatile (frequenza 1.3 Hz) tra 80 e 130 mmHg; alcuni campioni sono stati perfusi con condizioni pressorie venose come controllo. Nei campioni perfusi con flusso pulsatile è stato osservato, mediante colorazione dell'anticorpo anti-PCNA, un aumento della proliferazione cellulare dopo il quarto giorno di coltura, mentre nessuna variazione è stata osservata nel gruppo di controllo. La colorazione di Van Gieson (Figura 2.37) ha mostrato la diminuzione dello spessore della media nei campioni sottoposti a flusso pulsatile e nessuna variazione nel controllo. EC e SMC sono state identificate in entrambi i gruppi sperimentali, fino al giorno 7 di coltura, mediante colorazioni immunoistochimiche per α-SMA e fattore di vW.

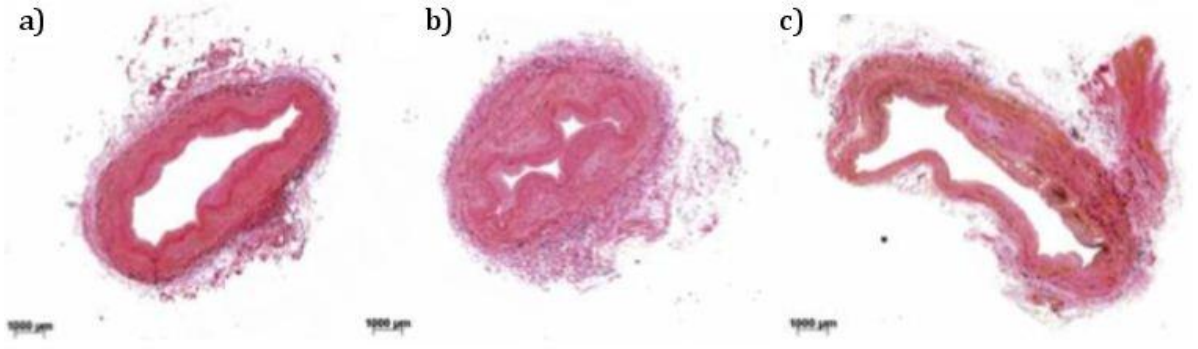


Figura 2.37 *Sezioni di Van Gieson su sezioni di vena safena al tempo 0 (a), al giorno 7 della coltura in condizioni venose (b), al giorno 7 della coltura in condizioni pulsatili (c). Adattata da [5].*

Nel 2011, Dummler [2] ha presentato un nuovo sistema per lo studio del fenomeno di arterializzazione della vena safena. Nel sistema (Figura 2.38) sono presenti sia una pompa roller in grado per la generazione di flusso pulsatile (Figura 2.39), sia una pompa a siringa, per il mantenimento di valori pressori costanti.

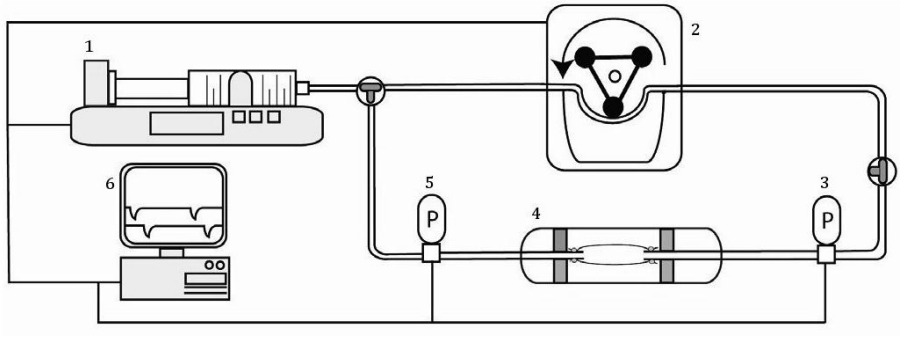


Figura 2.38 *Schema del sistema di coltura: pompa a siringa (1), pompa roller (2), trasduttori di pressione (3 e 5), camera di coltura (4), computer (6).*

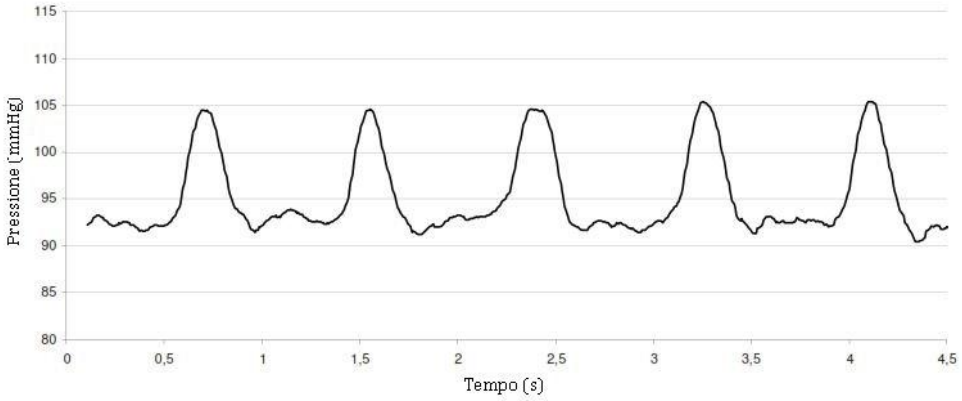


Figura 2.39 *Andamento della pressione realizzata dal sistema nel tempo.*

Campioni di vena safena umana sono stati perfusi, per un massimo di 14 giorni, in condizioni venose (Q=5 ml/min, P=10 mmHg) e arteriose (Q=50 ml/min, P_{media}=100 mmHg). Mediante saggio MTT è stata valutata la vitalità dei campioni al termine del periodo di coltura: quelli sottoposti a condizioni venose hanno mantenuto vitalità fino a 12 giorni di coltura, mentre per il gruppo in condizioni arteriose il limite massimo è stato di 7 giorni. Analisi morfologiche condotte con colorazione H/E hanno mostrato un aumento dello spessore dello strato intimale già dopo 3 giorni di coltura in condizioni arteriose; i campioni in condizioni venose non hanno, invece, subito alcuna modificazione di questo

tipo. Infine, da analisi zimografiche è emerso un significativo aumento dell'attività della MMP-2 in seguito all'esposizione al flusso arterioso (Figura 2.40).

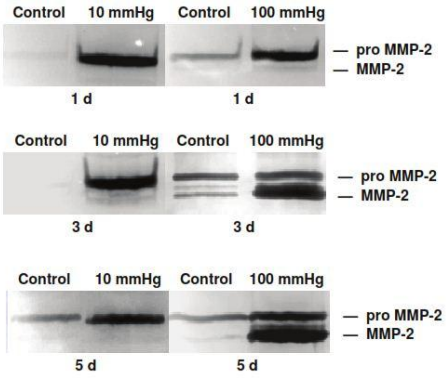


Figura 2.40 *Analisi zimografica dell'attività della MMP-2 su campioni di vena safena sottoposti a condizioni venose (10 mmHg) e arteriose (100 mmHg), il controllo rappresenta l'attività della MMP-2 in campioni non perfusi. 1d, 3d e 5d indicano i tempi di coltura pari, rispettivamente a 1, 3 e 5 giorni.*

La Tabella 2.2 riassume i dati tecnici relativi al tipo di attuatore utilizzato ed al volume di priming, omessi nella trattazione, e le condizioni fluidodinamiche imposte negli esperimenti con i relativi esiti biologici, per ognuno dei sistemi di perfusione appena descritti.

Attuatore	Perfusione	Priming	Condizioni fluidodinamiche	Effetto biologico	Ref
Pompa peristaltica (Watson Marlow 505-S, Falmouth, Cornwall, UK)	Staz	1 l	- Arteriose: Q=500 ml/min P=85 mmHg τ=0.9 Pa - Venose: Q=70 ml/min P=15 mmHg τ=0.1 Pa	Nessuno sviluppo di neointima in condizioni arteriose. Sviluppo di uno strato neointimale di 8 μm in condizioni venose.	Porter *et al.* [30]
Pompa peristaltica (L/S Modular Drive with Cartridge Pump Head, Cole Palmer)	Staz	0.5 l	Q=100 ml/min P=40 mmHg	Presenza di cellule in proliferazione nello strato endoteliale.	Surowiec *et al.* [31]
Sistema pompante (Cellmax Quad, Cellco, Germantown, MD)	Staz	n.p.	- Basso shear stress: τ=0.2-0.4 Pa - Alto shear stress: τ=0.9-1.2 Pa	Alto shear stress: Aumento espressione MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2. Aumento attività MMP-2. Aumento spessore dell'intima.	Patterson *et al.* [32]

Pompa peristaltica (L/S, Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., USA)	Staz	n.p.	τ=0.2-0.65 Pa	Aumento dello spessore dell'intima.	Rey *et al.* [33]
CELLMAX Artificial Capillary System (Spectrum Laboratories, Inc. Rancho Dominguez, CA)	Staz	n.p.	- Arteriose: Q=50 ml/min P=80 mmHg - Venose: Q=5 ml/min	Condizioni arteriose: perdita vitalità cellulare. Assenza fenomeni proliferativi.	Miyakawa *et al.* [34]
Pompa peristaltica (Cole Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA)	Staz	0.05 l (solo camera)	Q=100 ml/min P=100 mmHg	Proliferazione delle SMC crescente con il tempo di coltura.	Liao *et al.* [35]
Pompa peristaltica (ISM444, Ismatec SA, Glattbrugg, Switzerland)	Staz	0.3 l	- P=20 mmHg - Q=40 ml/min - Q=60 ml/min - τ=0.05-0.22 Pa (+destrano)	Mantenimento dell'integrità endoteliale: migliore con destrano; peggiore per Q più elevata; indipendente da P.	Hoenicka *et al.* [36]
Pompa peristaltica (Stockert, Stöckert Instrumente GmbH, Munich, Germany)	Puls	n.p.	- Arteriose: Q_{media}=200 ml/min P=100 mmHg - Venose: Q=40 ml/min P=20 mmHg	Condizioni arteriose: leggera perdita endoteliale e espressione raddoppiata di ICAM-1.	Golledge *et al.* [37]
- Pompa centrifuga (modello D, Biomecus, Minneapolis, MN) - Valvola a saracinesca	Puls	1.3 l	Q=100 ml/min P=120/80 mmHg	Endotelio continuo e intatto sovrapposto a tessuto connettivo e strato SMC.	Labadie *et al.* [38]
- Pompa peristaltica (L/S Modular Drive with Cartridge Pump Head, Cole Palmer) - PFS (Physiological Flow Simulator)	Puls	0.5 l	- Stazionarie: Q=140 ml/min P=100 mmHg - Pulsatili: Q_{media}=170 ml/min	Presenza strato endoteliale integro, mantenimento morfologia SMC, assenza modificazioni ECM.	Conklin *et al.* [39]
Pompa peristaltica (Masterflex)	Puls	0.5 l (solo camera)	- Venose: Q=10 ml/min P=25 mmHg - Flusso elevato: Q=40 ml/min P=25 mmHg - Incremento P a rampa: Q=10 ml/min P=25->75 mmHg - Controllo in shear stress: τ=1 Pa	Rapporto area intima/area media decrescente all'aumentare di τ. Condizioni venose e di incremento di P: maggiore aumento spessore dell'intima. Condizioni flusso elevato e controllo τ: minore ispessimento. Condizioni	Gusic *et al.* [40]

			- Pulsatili: Q=85 ml/min P_{media}=80 mmHg	pulsatili: zone inalterate, zone con iperplasia, zone con denudazione endoteliale.	
Pompa peristaltica (L/S, Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., USA)	Puls	n.p.	Q=120 ml/min P=80/40 mmHg τ=0.9-1.5 Pa	Mantenimento strato EC, fenomeni proliferativi evidenti nello strato intimale, significativo aumento spessore dell'intima e riduzione della media.	Saucy *et al.* [4]
- Pompa - Generatore di impulsi	Puls	5 l	Q_{media}=5000 ml/min P = 130/80 mmHg	Aumento della proliferazione cellulare, riduzione spessore media.	Voisard *et al.* [5]
- Pompa pulsatile (ISMATEC S2, Wertheim, Germany) - Pompa a siringa (MC Medizintechnik GmbH, Alzenau, Germany)	Puls	n.p.	- Arteriose: Q=50 ml/min P_{media}=100 mmHg - Venose: Q=5 ml/min P=10 mmHg	Condizioni arteriose: aumento spessore strato intimale e aumento attività MMP-2.	Dummler *et al.* [2]
Pompa peristaltica (L/S, Masterflex, Cole-Parmer Instrument Co., USA)	Puls	n.p.	- Alte P: Shear stress arterioso P = 90/65 mmHg - Basse P: Shear stress arterioso P = 8/6 mmHg	Per P elevate: formazione significativa di neointima, con presenza anormale di SMC, marcata presenza di cellule in proliferazione e aumento espressione e attività MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2.	Berard *et al.* [6]

Tabella 2.2 *Tabella tecnica riassuntiva dei sistemi di coltura ex vivo a perfusione per segmenti vascolari.*

2.2 Conclusioni

L'analisi della letteratura ha mostrato l'esistenza di molteplici modelli di *organ culture* realizzati per lo studio del fenomeno di arterializzazione a cui va incontro la vena safena impiegata come bypass aorto-coronarico.

I modelli statici sono caratterizzati dalla totale assenza di stimoli meccanici; questo, nell'ottica della riproduzione di condizioni fisiologiche realistiche, rappresenta una forte limitazione che rende, pertanto, questi sistemi inadatti allo scopo.

Al contrario, i setup che consentono la perfusione di segmenti di vena safena hanno permesso di replicare in modo fedele i processi che caratterizzano *in vivo* questi vasi. In particolare, la stimolazione con parametri biomeccanici paragonabili a quelli arteriosi ha indotto nei campioni vascolari l'innesco di fenomeni proliferativi e, conseguentemente, lo sviluppo di IH. Viceversa, il mantenimento di condizioni venose non ha comportato alterazioni morfologiche della struttura della parete dei vasi. Nel dettaglio, da un'approfondita analisi dello stato dell'arte, è emerso che bassi valori di portata ed assenza di stimoli pressori portano allo sviluppo di neointima, mentre questo fenomeno è inibito da portate maggiori [30]. Tuttavia, nei vasi sottoposti alle stesse condizioni di flusso, ma in presenza di uno stimolo pressorio si è osservato un comportamento opposto, con sviluppo di neointima al crescere della portata di perfusione [2, 33]. Infine, nei campioni sottoposti a flusso di tipo pulsatile, con portate elevate e regimi pressori simili alle condizioni arteriose, sono stati osservati fenomeni di aumento dello spessore intimale analoghi ai casi di sviluppo del VGD [2, 4-6].

Alla luce di quanto è emerso risulta chiaro che, per la comprensione delle dinamiche alla base dell'insorgenza del VGD, sia necessario tenere in considerazione la complessa natura della biomeccanica arteriosa nel suo insieme. Sebbene, ad oggi, esista una grande varietà di sistemi di stimolazione che consentono di riprodurre in modo sempre più accurato le condizioni fluidodinamiche a cui la vena safena è soggetta in seguito a trapianto in sede coronarica, la mancanza di uno studio sistematico dei meccanismi molecolari alla base dell'arterializzazione preclude la completa comprensione del fenomeno.

In questo contesto, sono state delineate le linee guida del sistema di coltura *ex vivo* descritto in questo lavoro di tesi. Anzitutto le scelte progettuali sono state effettuate con l'obiettivo di ottenere un sistema semplice e di facile impiego, con volume di priming limitato. Questo sistema è stato concepito per essere in grado di simulare le condizioni fluidodinamiche in ambiente venoso e le condizioni caratteristiche dell'ambiente arterioso in termini di pressione pulsatile, al fine di evidenziare gli effetti biologici indotti esclusivamente dalla pressione, escludendo gli effetti dello *shear stress*. Ciò che costituisce una reale innovazione rispetto agli altri EVCS descritti in letteratura è la presenza di una compartimentazione dell'ambiente intra-luminale e dell'ambiente extra-avventiziale. Nei

setup descritti infatti non è presente una separazione dei due ambienti al fine di applicare un condizionamento diverso. L'unica eccezione è rappresentata dal lavoro di Hoenicka [36], in cui però è solamente realizzata una perfusione in condizioni di portate diverse nel comparto intraluminale e in quello extra-avventiziale, al fine di contrastare l'aumento di pressione all'interno del vaso con la pressurizzazione del medium che lo circonda. La compartimentazione realizzata in questo lavoro di tesi, invece, è finalizzata a riprodurre ambienti biochimici diversi che consentano, ad esempio, l'utilizzo di medium con caratteristiche diverse nel comparto luminale e avventiziale, con diversi valori di concentrazione di ossigeno, come accade *in vivo*, lo screening di farmaci riproducendo ad esempio la somministrazione endovena, o, infine, la semina di popolazioni cellulari all'interno del lume del vaso che potrebbero interagire con le cellule residenti, influendo sullo sviluppo di IH.

Nel capitolo seguente, sarà descritta l'attività di progettazione e realizzazione di un sistema bicompartimentale per la coltura *ex vivo* di segmenti di vena safena.

3.

Progetto e dimensionamento dei sistemi di coltura

Il lavoro di tesi, svolto presso il Laboratorio di Micro e Biofluidodinamica Sperimentale (μBSLab) del DEIB (Dipartimento di Elettronica, Informazione e Bioingegneria) del Politecnico di Milano, si inserisce all'interno di un progetto più ampio, svolto in collaborazione con il gruppo di ricerca del Laboratorio di Ingegneria Tissutale Cardiovascolare (LIT) dell'I.R.C.C.S. Centro Cardiologico Monzino. Obiettivo del progetto è lo studio degli effetti di pattern di stimolazione arteriosa, generati attraverso l'impiego di un sistema di coltura *ex vivo*, su segmenti di vena safena umana. Il fine ultimo è il raggiungimento di una comprensione completa dei meccanismi cellulari alla base del fenomeno di arterializzazione che consenta, prospetticamente, l'individuazione di un trattamento di prevenzione o cura del *vein graft disease* (VGD).

In un lavoro di tesi precedente (Bono N. e Casadonte L., 2012 [7]), svolto sempre presso il μBSLab, è stato sviluppato un sistema di coltura *ex vivo* per sottoporre segmenti di vena safena umana ai pattern di stimolazione pressoria arteriosa a cui è sottoposto *in vivo* il graft venoso a seguito del bypass. Partendo dall'analisi del sistema esistente, il contributo apportato al progetto nel presente lavoro di tesi è consistito, inizialmente, nella revisione del disegno della camera di alloggiamento e coltura dei segmenti di vena safena al fine di ottimizzarla ed, in secondo luogo, nell'attribuzione di nuove caratteristiche al sistema, quali la separazione dell'ambiente intraluminale da quello esterno, ovvero extra-avventiziale, per poter applicare un condizionamento differente ai due ambienti.

In questo capitolo, dopo una breve descrizione della camera di coltura e del sistema di stimolazione già esistenti, saranno illustrate le fasi di progetto e di realizzazione di due nuove camere di alloggiamento dei vasi, ideate per interfacciarsi col sistema di stimolazione già collaudato. La prima camera di coltura è un'ottimazione della camera preesistente, volta a risolvere alcune criticità emerse durante il suo utilizzo in campagne sperimentali preliminari. Successivamente, mantenendo le soluzioni introdotte nella

camera ottimizzata, è stata progettata e realizzata una camera di coltura bicompartimentale, caratterizzata dalla separazione in compartimenti distinti dell'ambiente intraluminale ed extra-avventiziale del vaso, che consente un diverso condizionamento dei due compartimenti. Con l'obiettivo di condizionare diversamente l'ambiente interno ed esterno del vaso, nel tentativo di riprodurre condizioni simili a quelle sperimentate dal vaso *in vivo*, è stato sviluppato un sistema di deossigenazione, al fine di ottenere diverse condizioni ematochimiche nei due compartimenti e riprodurre le caratteristiche tipiche del tessuto parenchimale circostante il vaso.

In Figura 3.1 è rappresentato lo schema del metodo seguito per l'attività di progettazione e realizzazione del dispositivo.

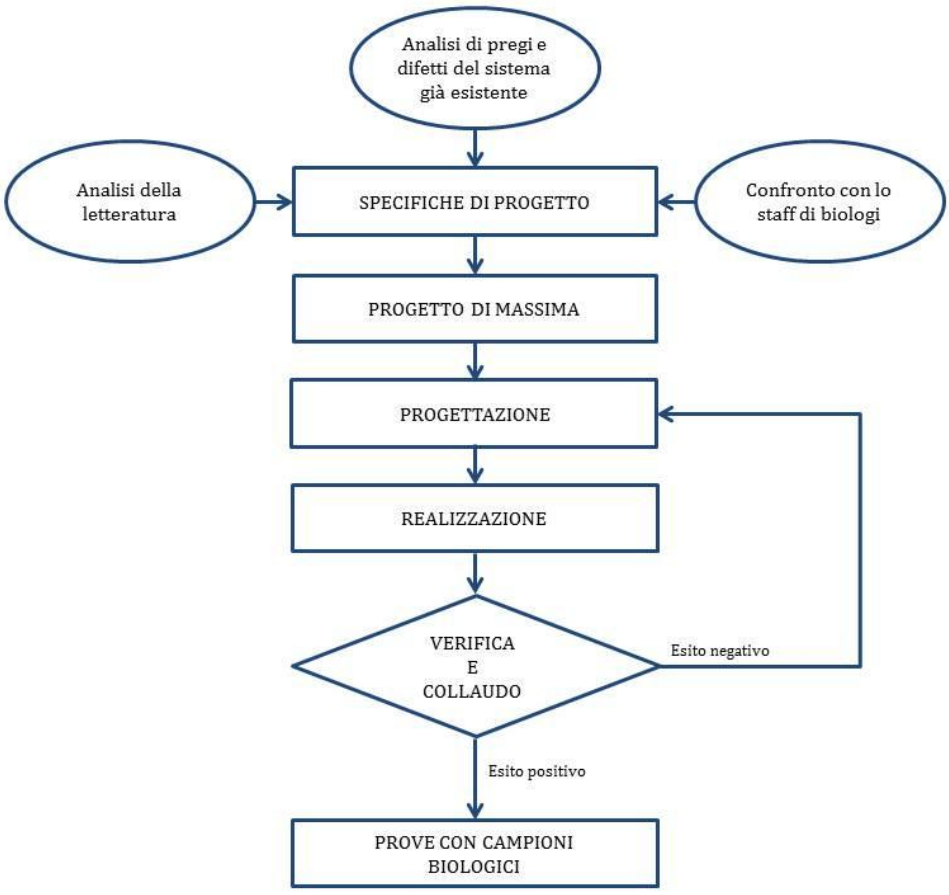


Figura 3.1 *Schema a blocchi del metodo seguito nell'attività di progettazione e realizzazione.*

Partendo dall'analisi del sistema pre-esistente, dallo stato dell'arte e dal confronto col gruppo di biologi che stanno utilizzando il sistema, è stata stilata una nuova lista di specifiche progettuali che tenga conto delle limitazioni riscontrate a livello della camera di coltura precedentemente realizzata. Il secondo step del processo consiste nella stesura di

un progetto di massima in cui vengono delineate le soluzioni progettuali adottate per rispondere alla lista delle specifiche. Il passo successivo consiste, quindi, nella vera e propria progettazione, mediante disegni e modelli CAD, ed è seguito dalla fase di realizzazione. I prototipi realizzati sono, quindi, stati sottoposti a collaudo, al fine di verificare l'effettivo rispetto delle specifiche di progetto. Infine, i prototipi più promettenti sono stati impiegati in campagne sperimentali con campioni biologici umani.

3.1 Overview sul sistema di coltura *ex vivo*

Il sistema di coltura *ex vivo* è presentato in Figura 3.2; gli elementi costitutivi del sistema sono la camera per l'alloggiamento del vaso, la pompa peristaltica, la centralina di cablaggio, la camera di *compliance* (realizzata mediante una siringa da 5 ml, riempita con 1.6 ml di medium e 3.4 ml di aria; non mostrata in figura), l'elettrovalvola, il trasduttore di pressione, il computer e il circuito idraulico di raccordo.

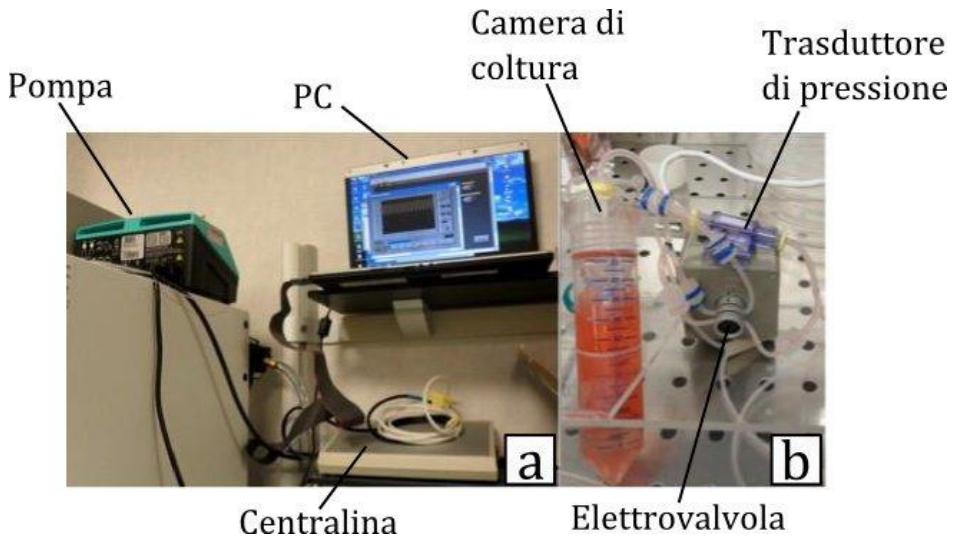


Figura 3.2 *Fotografia del sistema preesistente in esercizio. Si distinguono gli elementi mantenuti all'esterno dell'incubatore (a): il PC, la pompa e la centralina; in (b) invece si distinguono gli elementi collocati all'interno dell' incubatore: la camera di coltura, l'elettrovalvola pinza-tubo ed il sensore di pressione.*

La camera di coltura è costituita dall'accoppiamento tra un tappo ed un telaio portavaso e da una camera esterna (Figura 3.3). La camera esterna, realizzata con un tubo falcon da 50 ml (International P.B.I. S.P.A., Milano, Italia) svolge una duplice funzione: delimita il volume in cui avviene la coltura alloggiando al suo interno il telaio portavaso e, in secondo luogo, svolge la funzione di reservoir per il medium. Il telaio portavaso,

realizzato in polimetilmetacrilato (PMMA), ha la funzione di alloggiare i campioni di tessuto; i vasi vengono calzati su appositi connettori, presenti sul telaio, che ne consentono anche la perfusione, e sono vincolati al telaio mediante *vessel loop* (Tecnokit S.r.l., Milano, Italia), un filo di silicone flessibile ed estensibile elasticamente.

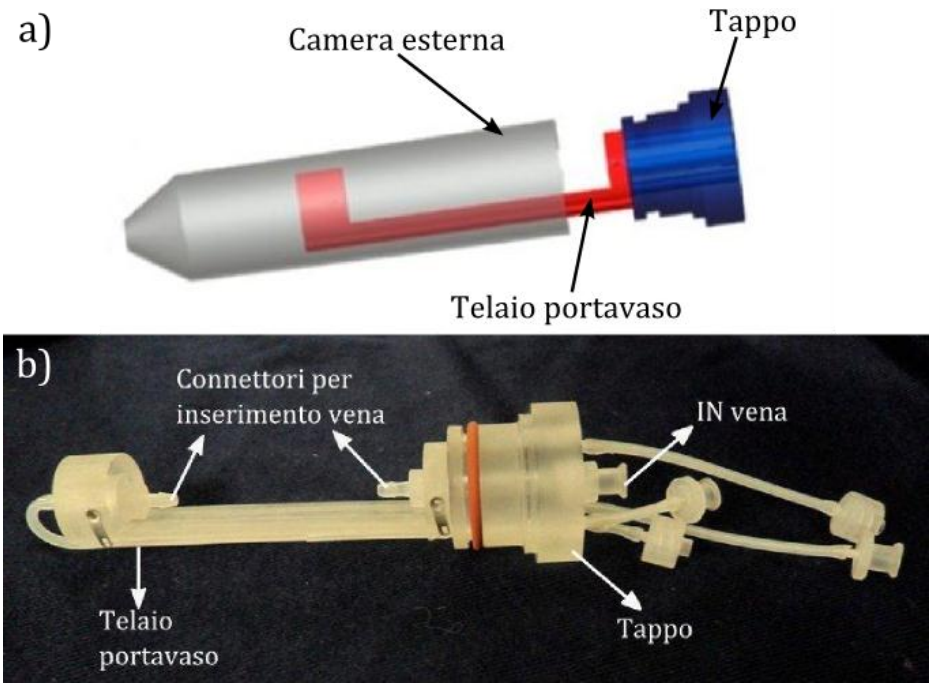


Figura 3.3 *Disegno CAD della camera di coltura del sistema preesistente (a) in cui si distinguono il tapppo, il telaio portavaso e la camera esterna che realizza la riserva della camera di coltura. Fotografia dell'accoppiamento tappo/telaio portavaso (b); si distinguono il telaio, con i connettori su cui viene calzato il vaso e le alette metalliche, l'O-ring posizionato nell'apposita cava, il tappo con il port per l'accesso alla vena e i tubi in silicone, inseriti nei fori appositi presenti sul tappo.*

Il tappo, realizzato in PMMA e vincolato al telaio portavaso, realizza l'interfaccia tra telaio e camera esterna; cinque fori (port), realizzati sul tappo consentono la connessione con il sistema di stimolazione e l'imposizione di pressione atmosferica all'interno della camera (Figura 3.4).

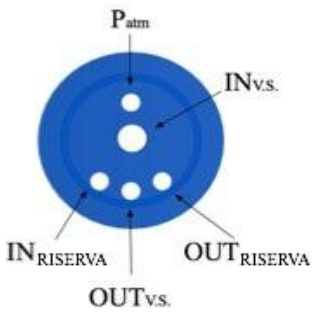


Figura 3.4 *Vista frontale del tappo in cui sono rappresentati schematicamente i fori sulla superficie. P_{atm} rappresenta il port per la pressione atmosferica; $IN_{V.S.}$ e $OUT_{V.S.}$ rappresentano i fori per l'ingresso e l'uscita del medium dal vaso; $IN_{RISERVA}$ e $OUT_{RISERVA}$ indicano l'ingresso e l'uscita del medium dalla riserva contenuta nella falcon.*

Sulla parte posteriore del telaio portavaso, in corrispondenza dei port $IN_{RISERVA}$, $OUT_{V.S.}$ e $OUT_{RISERVA}$ sono presenti tre scanalature, a cui sono incollati i tubi del circuito di stimolazione. Sulla superficie esterna del tappo, nelle intercapedini tra i tubi e i port in cui sono inseriti, è apposto del silicone Sylgard 184 (Dow Corning) per mantenere i tubi in sede ed evitare eventuali trafilamenti di fluido e infiltrazioni batteriche. Sul telaio sono presenti, infine, quattro fori per l'incollaggio delle alette metalliche utilizzate per fissare il vaso. Il vincolo tra tappo e telaio è realizzato mediante incollaggio con colla acrilica mentre l'accoppiamento tra il tappo e la camera esterna è ottenuto mediante un O-ring in silicone (Angst+Pfister).

Il circuito di stimolazione che si interfaccia con la camera di coltura è costituito da due sottosistemi: il sottosistema idraulico ed il sottosistema di monitoraggio e controllo.

Il sottosistema idraulico è costituito da un sistema pompante e dal circuito di raccordo. Il sistema pompante è rappresentato dalla pompa peristaltica Watson-Marlow 323 Du (Watson Marlow Group, UK); la scelta di questo tipo di pompa soddisfa la specifica di mantenimento della sterilità all'interno del sistema di coltura. Il circuito idraulico è costituito da un tubo sottopompa in PharMed BPT® (Carlo Erba Reagenti) e da tubi in silicone Platinum Cured (Cole Parmer) dimensionati in modo da garantire il corretto livello di ossigenazione, tenendo al contempo in considerazione la necessità di limitare le perdite di carico lungo il circuito. Una camera di *compliance*, realizzata mediante una siringa da 5 ml, riempita con medium di coltura ed aria in volumi noti (pari a 1.6 ml di medium e 3.4 ml di aria), posta a valle della pompa, filtra l'effetto dei rulli della pompa, consentendo di ottenere la forma d'onda pressoria desiderata.

Il sottosistema di monitoraggio e controllo consiste di componenti hardware e software che consentono, agendo sul circuito idraulico, di fornire gli stimoli pressori adeguati al segmento di vaso e di effettuare il ricircolo del medium. La pompa e l'elettrovalvola pinza-tubo S305-09 (Sirai® Elettromeccanica, Bussero, Italia) rappresentano gli elementi hardware attivi relativi alla parte idraulica di attuazione. Un sensore flow-through Pendotech Press-S-000 (PendoTECH, Princeton, NJ, USA) consente l'acquisizione del segnale di pressione. La componente elettronica dell'hardware è, invece, composta dalla scheda di acquisizione A/D DAQCard NI 6036E ad interfaccia PCMCIA (National Instruments®, Austin, TX, USA) che permette di interfacciare la pompa, l'elettrovalvola e il sensore di pressione al PC per mezzo di una centralina di cablaggio. La componente software di controllo è rappresentata da un programma sviluppato in

ambiente di programmazione LabView®: il software PINE (Pulsatile IN vitro Emulator). Questo software consente di controllare gli attuatori idraulici al fine di fornire una stimolazione pressoria pulsatile programmabile e un ricircolo del medium di coltura e, in secondo luogo, di comandare direttamente gli attuatori. Il sistema di monitoraggio e controllo riceve in ingresso segnali dal trasduttore di pressione e regola opportunamente la portata erogata dalla pompa mediante un controllo in retroazione. Sono previste due fasi di funzionamento, regolarmente alternate: la fase di stimolazione e la fase di ricircolo. Durante la fase di stimolazione (Figura 3.5) il segmento di vaso viene caricato e scaricato in volume tramite la pompa, producendo un andamento di pressione oscillante tra i due valori limite impostati (i.e. 80-120 mmHg); questa fase ha una durata pari a 10 minuti. La fase di ricircolo, della durata di 2 minuti, ha lo scopo di garantire un sufficiente apporto di ossigeno e di nutrienti al vaso in coltura. Queste due fasi sono intervallate da due sottofasi di carico e di scarico del vaso. La variazione di configurazione dell'elettrovalvola determina il passaggio tra la fase di stimolazione e la fase di ricircolo. In Figura 3.5 si può osservare un esempio del tracciato pressorio a cui il vaso è sottoposto (fase di stimolazione); si distinguono le sottofasi di carico e scarico che, rispettivamente, precedono e seguono la fase di stimolazione.

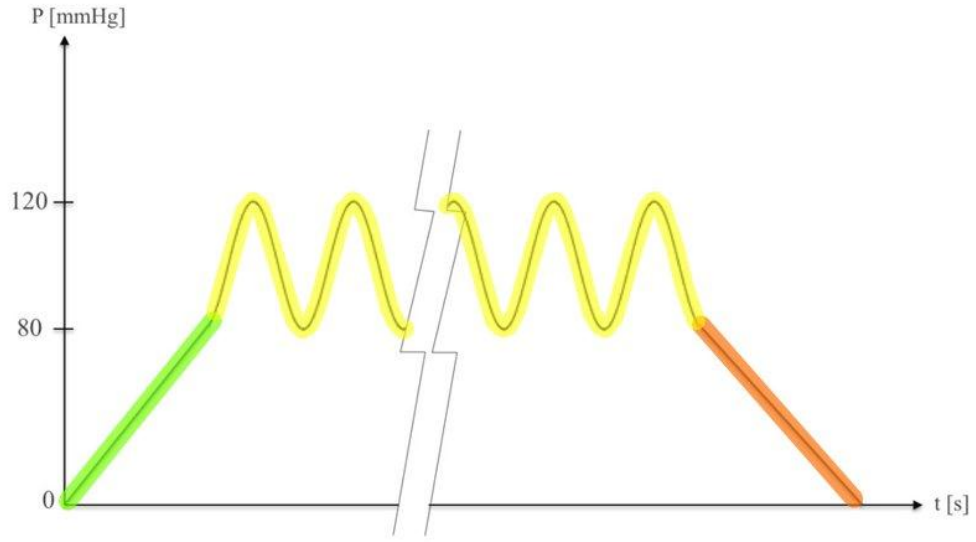


Figura 3.5 *Andamento schematico della pressione all'interno del vaso in fase si stimolazione; si distinguono le sottofasi di carico (in verde) e scarico (in arancione) che precedono e seguono la fase di pulsazione ciclica (in giallo).*

3.1.1 Analisi del sistema di coltura

Il collaudo del sistema e gli esperimenti preliminari con campioni di vena safena hanno dato risultati soddisfacenti; tuttavia, l'utilizzo del sistema ha messo in luce alcune criticità che hanno spinto ad una revisione, in particolare, della camera di coltura.

L'interfaccia tra il circuito idraulico e la camera è stato uno dei primi elementi presi in considerazione; l'inserimento dei tubi in silicone direttamente nel tappo è stato ritenuto, infatti, un possibile elemento di debolezza dal punto di vista del mantenimento della sterilità a causa della elevata deformabilità del materiale e della facilità di rottura del silicone utilizzato come riempitivo delle intercapedini, in quanto questo materiale non aderisce al PMMA della camera di coltura. In secondo luogo, la particolare geometria del telaio portavaso ne rende possibile la realizzazione esclusivamente impiegando il quarto asse della fresa a controllo numerico Modela MDX-40, richiedendo tempistiche di realizzazione molto elevate, dell'ordine di alcune ore. La struttura complessiva, costituita dall'unione del telaio portavaso e del tappo, invece è risultata molto soddisfacente; questa permette, infatti, di lavorare in verticale, limitando fortemente lo spazio occupato all'interno dell'incubatore in fase di coltura. Infine, l'utilizzo di un tubo falcon come camera esterna è estremamente vantaggioso in quanto si tratta di un prodotto di dimensioni standard, sterile e disposable presso il laboratorio LIT del Monzino.

Alla luce di queste osservazioni il disegno della camera di coltura è stato revisionato, in modo da ottimizzarla.

3.2 Ottimizzazione della camera di coltura

3.2.1 Specifiche di progetto della camera di coltura ottimizzata

La progettazione della nuova camera di coltura ha tenuto in considerazione le specifiche individuate in fase di realizzazione del sistema esistente appena descritto. Esse sono:

- sterilizzabilità e biocompatibilità dei componenti, caratteristiche fondamentali per l'interazione con materiali di origine biologica;
- mantenimento della pervietà del circuito ed isolamento dall'ambiente esterno, al fine di evitare fenomeni di contaminazione batterica;

- facilità di montaggio sotto cappa e maneggevolezza;
- trasparenza del dispositivo per il monitoraggio del campione in coltura;
- ingombro ridotto, compatibile con l'utilizzo in incubatore;
- facilità di ricambio del medium di coltura;
- facilità di verifica funzionale del sistema;
- ridotto volume di priming, al fine di contenere i costi relativi alle quantità di componenti e sostanze disciolte nel medium di coltura;
- versatilità del sistema, al fine di poter alloggiare segmenti di vena safena di diametro e lunghezza varibili;
- facilità di alloggiamento del campione biologico all'interno della camera di coltura;
- stabilità del campione biologico nel tempo e mantenimento in vita dello stesso grazie ad un adeguato trasporto di ossigeno e nutrienti al tessuto;
- generazione delle condizioni tipiche dell'ambiente arterioso coronarico in vivo con particolare riferimento allo stimolo pressorio imposto (80÷120 mmHg).

Inoltre, alla luce di quanto emerso dall'analisi delle criticità del dispositivo esistente, sono state aggiunte alla lista delle specifiche progettuali la semplicità di realizzazione del dispositivo alle macchine utensili, la riduzione del tempo macchina e una maggiore attenzione agli elementi di connessione che potrebbero determinare l'insorgenza di contaminazione.

3.2.2 Progettazione e realizzazione della camera di coltura ottimizzata

L'attività di progettazione, svolta interamente utilizzando il software CAD 3D Pro/ENGINEER Wildfire 4.0 (Parametric Technology Corporation, PTC) per la modellazione 3D, ha portato alla realizzazione di una nuova camera di coltura che è stata valutata ed approvata dallo staff di biologi.

3.2.2.1 Scelta dei materiali

Come materiale per la camera di coltura è stato confermato l'utilizzo del PMMA (Plasting S.r.l., Segrate, Italia); questo materiale infatti:

- può essere sottoposto a vari cicli di sterilizzazione in ossido di etilene (EtO) senza rilasciare residui tossici e senza subire modificazioni delle proprietà meccaniche;

- è otticamente trasparente e consente, quindi, l'ispezione visiva del campione in coltura;
- ha un costo relativamente limitato;
- è facilmente lavorabile mediante la macchine utensili disponibili presso il Laboratorio di Prototipazione del μBSLab.

3.2.2.2 Progettazione

In Figura 3.6 è riportato il disegno CAD della nuova camera di coltura. Per i disegni tecnici si faccia riferimento all'APPENDICE A.

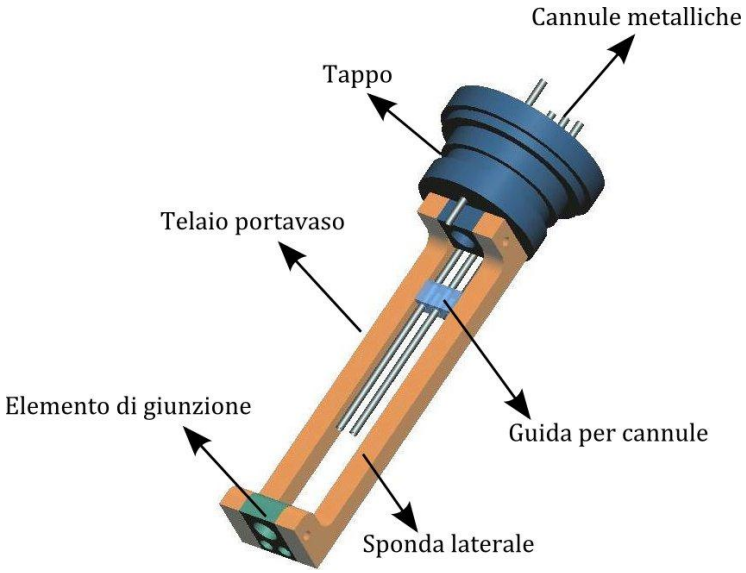


Figura 3.6 *Disegno CAD della nuova camera di coltura in cui si distinguono il tappo, in cui sono inserite le cannule metalliche, e il telaio portavaso, a sua volta costituito di due sponde laterali unite da un elemento di giunzione. Si nota anche la presenza di una guida per l'inserimento delle cannule e di un elemento, presente sul tappo, simile all'elemento di giunzione, che funge da supporto per l'incollaggio delle sponde nella parte superiore.*

La nuova soluzione progettuale comporta una realizzazione più semplice della struttura del telaio portavaso che, in questa versione, non è più realizzato come un pezzo unico. Il nuovo telaio è costituito da due sponde laterali e da un elemento di giunzione; questi elementi vengono realizzati separatamente e, in seguito, composti a formare la struttura complessiva mediante incollaggio. Questa soluzione progettuale comporta una notevole riduzione dei tempi di realizzazione alle macchine utensili, che da alcune ore sono state ridotti ad alcuni minuti.

In questa nuova versione, la camera di coltura costituita dai seguenti elementi:

- il telaio portavaso, la cui funzione è quella di fornire il sostegno per l'alloggiamento del vaso, a sua volta costituito da due sponde laterali, da un elemento di giunzione tra esse

e da una guida per l'inserimento delle cannule metalliche, la cui funzione è quella di mettere in connessione il circuito idraulico con l'interno della camera,

- il tappo per sigillare l'interno della camera di coltura, che presenta fori passanti per l'inserimento delle cannule metalliche.

La geometria delle sponde laterali è molto semplificata (Figura 3.7); questo ne rende la produzione molto veloce, senza comportare una perdita in maneggevolezza e resistenza del telaio. Su entrambe le sponde sono presenti due fori destinati all'incollaggio delle alette metalliche per il fissaggio del vaso mediante *vessel loop*. La lunghezza del telaio consente l'alloggiamento di vena con lunghezza massima pari a 7 cm.

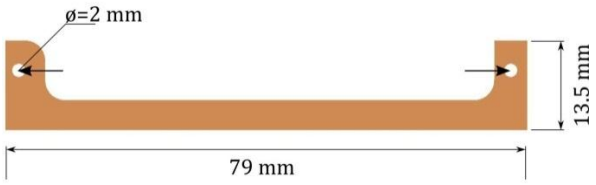


Figura 3.7 *Disegno CAD della sponda laterale del telaio portavaso; le frecce indicano i fori per l'incollaggio delle alette metalliche.*

L'elemento di giunzione (Figura 3.8) tra le due sponde presenta un foro filettato centrale con diametro 5.5 mm e due fori laterali con diametro 3 mm.

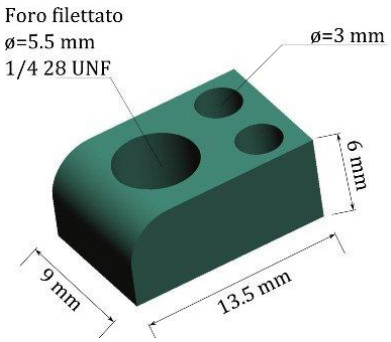


Figura 3.8 *Disegno CAD dell'elemento di giunzioni del telaio portavaso; i due fori con ø=3 mm consentono l'inserimento dei tubi in silicone che vengono collegati alla parte terminale delle cannule metalliche (Figura 3.6), il foro centrale di ø=5.5 mm, filettato, consente il posizionamento del connettore su cui viene calzata la vena e del connettore che connette l'uscita del vaso al circuito.*

Il foro centrale viene utilizzato per alloggiare due connettori in polipropilene che presentano, da un lato, un attacco filettato e, dall'altro lato, una struttura calza-tubo. I due fori di dimensioni minori vengono utilizzati come guide per i tubi in silicone presenti

all'interno della camera, in modo da confinarne i movimenti per non intralciare le operazioni di montaggio del sistema sotto cappa biologica.

Anche il disegno del tappo è stato adattato alla nuova struttura del telaio portavaso, mantenendo, però, le caratteristiche che lo rendono interfacciabile con il tubo falcon da 50 ml utilizzata come camera esterna. Nella nuova versione l'altezza complessiva del tappo è ridotta di circa 1 cm, questo consente l'utilizzo di minori quantità di materiale, senza sostanziali alterazioni della funzionalità e della maneggevolezza del sistema. Alla base del tappo è stato introdotto un elemento con struttura simile all'elemento di giunzione del telaio. Questo elemento è destinato a fornire le superfici per l'incollaggio del telaio al tappo e, inoltre, presenta un foro filettato per l'inserimento di un connettore in polipropilene per l'ancoraggio del vaso. Infine, i fori presenti nel tappo sono stati ridisposti per adeguarsi alla nuova geometria squadrata del telaio (Figura 3.9).

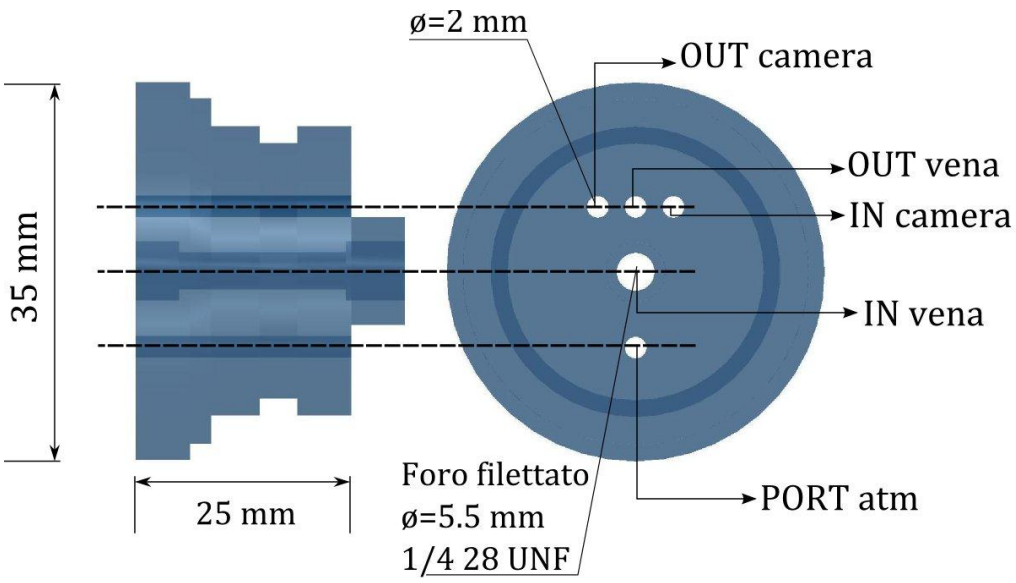


Figura 3.9 *Disegno CAD del tappo. Il foro centrale è filettato su entrambe le facce del tappo, questo consente di inserire, nella faccia inferiore, il connettore su cui calzare il vaso, e, nella faccia superiore, il connettore a cui connettere il circuito.*

Il tappo presenta cinque fori: due sono i fori di ingresso e di uscita del vaso (IN vena e OUT vena), due i fori di ingresso e di uscita della riserva (IN camera e OUT camera), il quinto consente il mantenimento della pressione atmosferica all'intero della camera (PORT atm). I fori nel tappo, ad eccezione dell'ingresso del vaso, sono stati utilizzati per l'inserimento di cannule in acciaio, ottenute tagliando alla lunghezza desiderata aghi spinali di diametro pari a 14 G (SURFLO® ETFE I.V. Catheters, Terumo). Le cannule sono state fissate al tappo mediante incollaggio con colla acrilica, lasciando circa 1 cm di cannula

sporgente rispetto alla superficie superiore del tappo. Sui tratti di cannula in eccesso sono stati poi calzati i tubi del circuito idraulico del sistema di stimolazione. All'apice della cannula inserita nel foro per il mantenimento della pressione atmosferica, una connesione luer consente il facile posizionamento di un filtro HEPA che, grazie alla presenza di una membrana filtrante con pori di dimensioni pari a 0.2 μm, blocca l'ingresso di agenti contaminanti pur consentendo lo scambio di gas. La presenza delle cannule metalliche consente di avere un'interfaccia rigida tra circuito e tappo e, inoltre, aumenta notevolmente la resistenza del telaio portavaso, attraverso i vari elementi di contatto trasversali, tra cui una guida (Figura 3.10) nella quale, a livello del telaio, sono infilate le cannule e che, essendo incollata alle sponde del telaio, aumenta ulteriormente la resistenza complessiva della struttura.

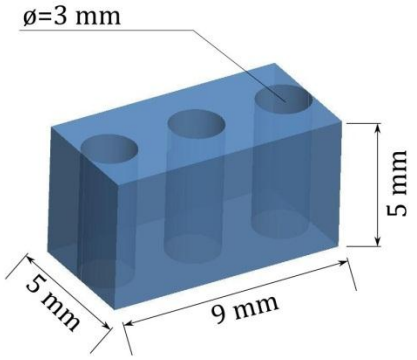


Figura 3.10 *Disegno CAD della guida per le cannule metalliche.*

L'alloggiamento del vaso è ottenuto mediante due connettori in polipropilene avvitati negli appositi fori realizzati nel tappo e nell'elemento di giunzione tra le sponde del telaio. La variabilità osservata nel diametro del lume dei vasi ha portato alla scelta di due tipi di connettori intercambiabili con diverso diametro interno (Codice S210-6, con diametro interno 1.6 mm e Codice S220-6, con diametro interno 2.25 mm, Value Plastics). Il circuito in uscita dal vaso è realizzato mediante un tubo in silicone posto tra un secondo connettore, avvitato nella parte inferiore del telaio, e la cannula in acciaio.

3.2.2.3 Realizzazione della camera

Il tappo è stato realizzato mediante fresa a controllo numerico Modela MDX-40, partendo da una barra cilindrica, di diametro pari almeno al diametro finale del pezzo, o da un blocco di PMMA (Figura 3.11a). Le sponde laterali e l'elemento di giunzione del telaio

portavaso e la guida per le cannule sono, invece, state realizzate con il laser a CO_2 VersaLaser VLS 2.30 (Figura 3.11b), partendo da lastre in PMMA di spessore pari allo spessore finale desiderato, pari cioè a 5 mm per le sponde e la guida per le cannule e a 6 mm per l'elemento di giunzione del telaio.

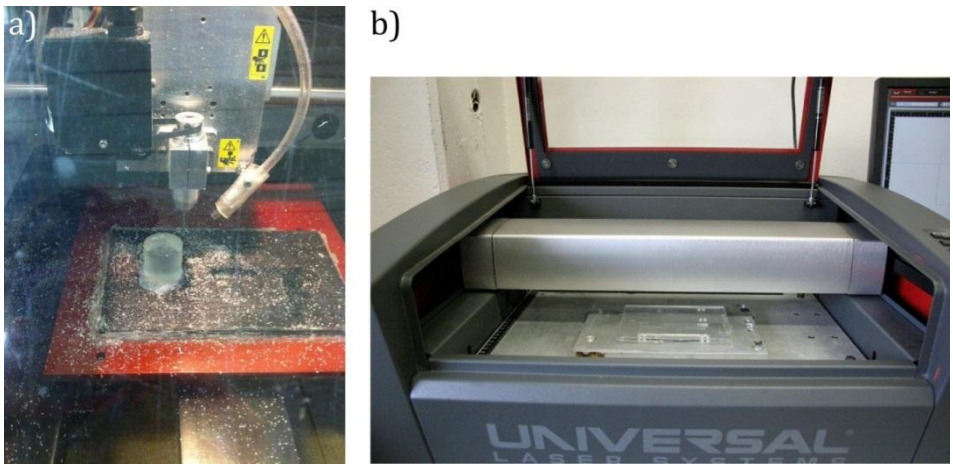


Figura 3.11 *Lavorazione del tappo mediante la fresa a controllo numerico Modela MDX-40 (a) e realizzazione di una delle sponde laterali al laser (b).*

In questa fase sono stati realizzati tre esemplari del sistema; in Figura 3.12 è mostrata una fotografia della camera di coltura ottimizzata, in cui tutti i tubi in silicone, necessari a realizzare il circuito idraulico, sono correttamente posizionati.

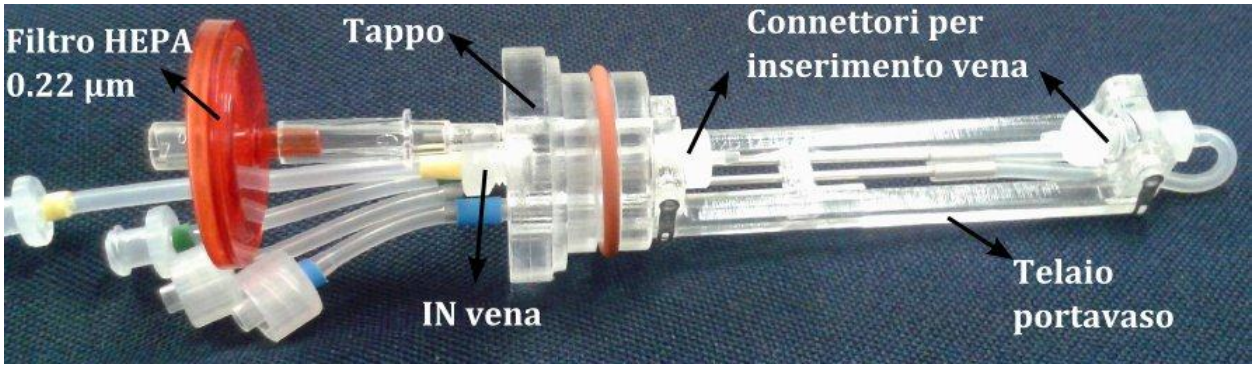


Figura 3.12 *Fotografia della nuova camera di coltura.*

3.2.3 Analisi della camera di coltura ottimizzata

La camera di coltura realizzata soddisfa le specifiche delineate in fase di progettazione e, inoltre, supera le limitazioni riscontrate nell'utilizzo della camera precedente. In

particolare la forma squadrata del telaio portavaso ne aumenta la stabilità e, di conseguenza, la maneggevolezza durante le fasi di montaggio del vaso sotto cappa. Inoltre, l'utilizzo delle cannule metalliche rende molto più stabile ed affidabile l'accoppiamento tra il circuito idraulico e il tappo, riducendo il rischio di infiltrazioni batteriche in questo punto. La presenza di un supporto rigido per il posizionamento del filtro HEPA consente di mantenerlo in posizione verticale, evitando che si bagni a causa di gocciolamenti di medium o di condensa e, quindi, evitando di doverlo sostituire. In ultimo, la semplificazione della geometria del telaio e l'utilizzo del laser per la realizzazione di alcuni pezzi rende la lavorazione più semplice e veloce.

È stata verificata la compatibilità della nuova camera di coltura con il sistema di stimolazione precedentemente sviluppato. Non sono state riscontrate problematiche in questa fase e, pertanto, non è stato necessario apportare modifiche né al circuito idraulico né a livello del sistema di controllo. In Figura 3.13 è riportata una porzione del tracciato pressorio ottenuto stimolando un sostituto artificiale tubolare in silicone, di dimensioni simili al campione biologico, all'interno della nuova camera di coltura. La forma d'onda e il range pressorio sono quelli desiderati.

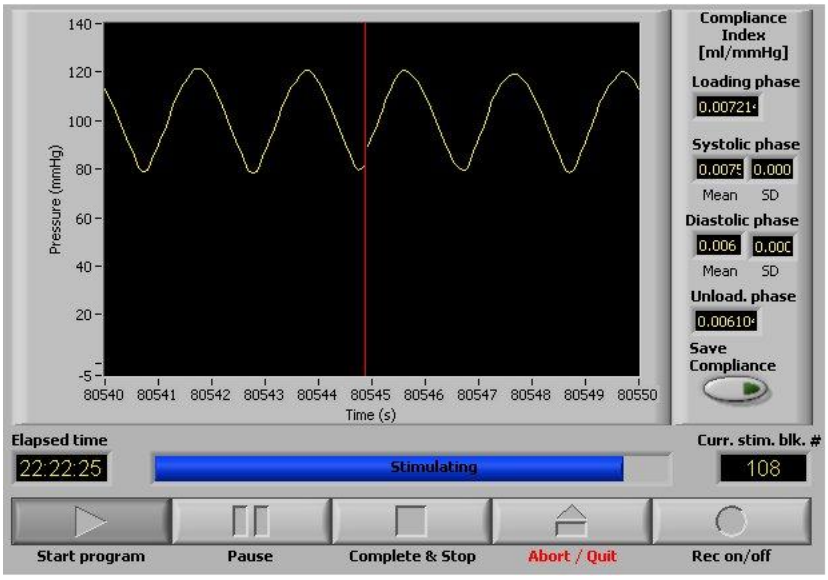


Figura 3.13 *Forma d'onda durante la fase di stimolazione con sostituto artificiale in silicone.*

La camera di coltura ottimizzata è stata, quindi, impiegata in una campagna sperimentale estensiva volta a valutare il rimodellamento in segmenti di vena safena umana, sottoposti a condizioni CABG-like, condotta presso il laboratorio LIT del Centro Cardiologico Monzino. Inoltre, mantenendo le soluzioni introdotte nella fase di

ottimizzazione della camera, che da ora sarà definita monocompartimentale, è stata progettata è realizzata una seconda camera di coltura, che da ora sarà definita bicompartimentale, caratterizzata da una suddivisione in compartimenti distinti dell'ambiente intraluminale ed extra-avventiziale, che ne renda possibile un diverso condizionamento.

3.3 Progetto di massima del sistema bicompartimentale

L'obiettivo di riprodurre fedelmente le condizioni in cui si trova la vena safena quando viene utilizzata come bypass di arterie coronarie ha spinto a focalizzare l'attenzione sulle differenti caratteristiche dell'ambiente presente all'interno del vaso ed al suo esterno. Infatti, mentre all'interno del vaso scorre sangue con pressioni parziali di ossigeno arteriose, pari a 160 mmHg, l'esterno del vaso è circondato da tessuto parenchimale caratterizzato da livelli venosi di pressioni parziali di ossigeno, pari a 38 mmHg.

La seconda fase progettuale del lavoro di tesi prevede quindi la realizzazione di una separazione dell'ambiente intraluminale dall'ambiente extra-avventiziale, che consenta un diverso condizionamento dei due compartimenti. In particolare, è stato sviluppato un sistema di deossigenazione, al fine di ottenere una differente concentrazione di ossigeno nel medium nei due diversi compartimenti. Tuttavia, la realizzazione di due ambienti separati consente non solo di operare dal punto di vista della concentrazione di gas disciolti, ma anche, ad esempio, di introdurre farmaci solo all'interno del vaso, come avviene fisiologicamente in caso di somministrazione endovena, o di esplorare gli effetti di *cell seeding* nel lume del vaso.

In questa fase progettuale è stata mantenuta la lista di specifiche già individuate e riportate nel paragrafo 3.2.1, a cui si è aggiunta la specifica relativa alla realizzazione di due compartimenti separati, per la perfusione dell'interno e dell'esterno del vaso, e la realizzazione di un sistema per la deossigenazione del compartimento esterno.

In Figura 3.14 è riportata una rappresentazione schematica del sistema con compartimentazione. Il sistema è composto dalla camera di coltura che risulta interfacciata a due circuiti idraulicamente separati, alimentati da due reservoir distinti. Il medium che scorre all'interno del vaso è movimentato dal sistema di stimolazione precedentemente

sviluppato; il medium presente all'esterno del vaso è, invece, ricircolato, grazie ad un secondo sistema pompante, e deossigenato, prima di essere reintrodotto nella camera.

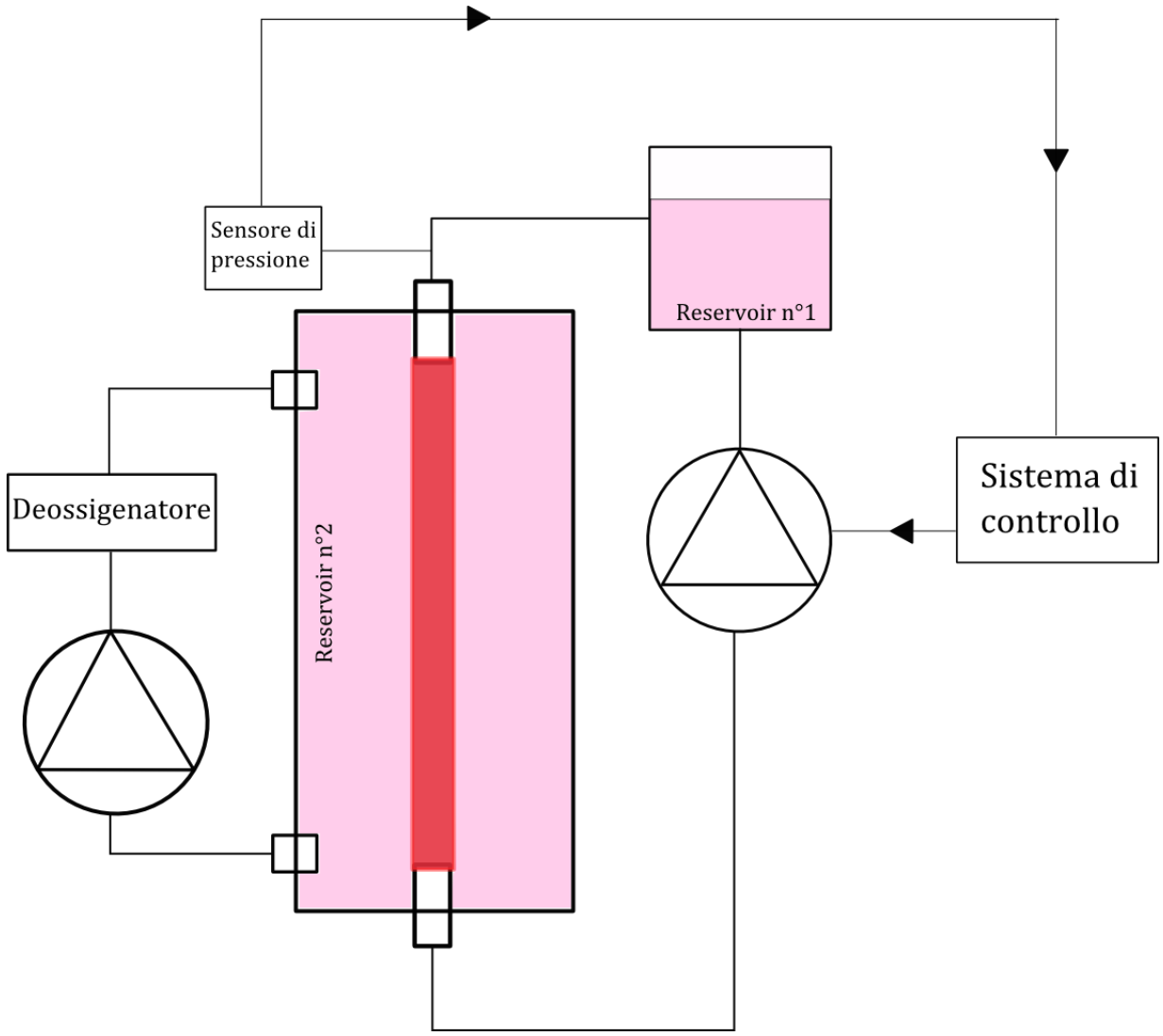


Figura 3.14 *Schema rappresentativo della camera di coltura, del circuito di stimolazione e del circuito di deossigenazione. La camera di coltura alloggia il segmento di vena safena umana e presenta due coppie di accessi che la connettono a due circuiti distinti. Il circuito di stimolazione è costituito dal sottosistema idraulico (elemento pompante e circuito idraulico di raccordo) e dal sistema di controllo. Il circuito di deossigenazione è costituito da un elemento pompante, dal deossigenatore e dalla circuiteria di raccordo.*

3.3.1 Progettazione e realizzazione della camera di coltura bicompartimentale

3.3.1.1 Progettazione

Per l'attività di progettazione si è ricorsi nuovamente all'impiego del software CAD 3D Pro/ENGINEER Wildfire 4.0 (Parametric Technology Corporation, PTC); inoltre, la scelta

del materiale per la realizzazione del prototipo è ricaduta nuovamente sul PMMA, alla luce delle caratteristiche già delineate nel paragrafo 3.2.2.1.

Durante la fase di progettazione si è scelto di mantenere l'utilizzo del tubo falcon da 50 ml come camera esterna e di non introdurre un secondo reservoir, esterno alla camera di coltura, sulla linea del circuito. Si è quindi optato per una soluzione in cui il secondo reservoir è contenuto all'interno del primo (tubo falcon). Queste scelte hanno quindi imposto la revisione del disegno del tappo e del telaio portavaso per renderli compatibili con l'inserimento del secondo reservoir all'interno del tubo falcon. In Figura 3.15 è riportato un disegno CAD del prototipo parzialmente assemblato, in cui si può distinguere la presenza della seconda camera, caratterizzata da volumi inferiori, all'interno della camera esterna. Per i disegni tecnici si faccia riferimento all'APPENDICE A.

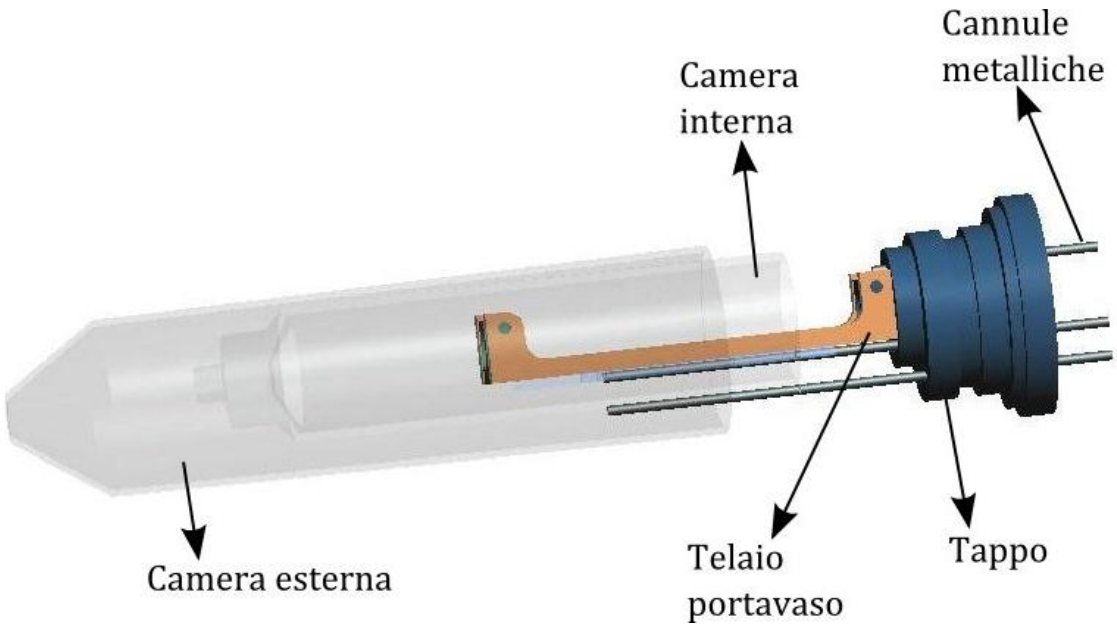


Figura 3.15 *Disegno CAD del prototipo parzialmente assemblato. In esso si distinguono il tappo, il telaio portavaso, le cannule metalliche d'accesso, la camera interna e la camera esterna.*

In Figura 3.16 è riportato uno schema della camera bicompartimentale in sezione, in cui si possono distinguere gli elementi che realizzano la compartimentazione. In particolare si osserva la presenza di due camere concentriche, la camera interna e la camera esterna, che vanno a costituire rispettivamente il compartimento extra-avventiziale ed il reservoir del compartimento intraluminale, costituito dalla vena safena.

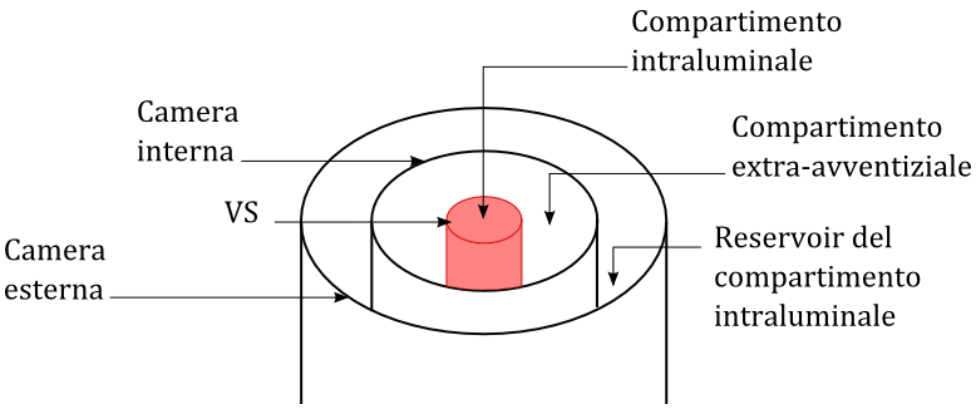


Figura 3.16 *Rappresentazione in sezione degli elementi che realizzano la compartimentazione: la camera interna va a realizzare il compartimento extra-avventiziale, la camera esterna costituisce il reservoir del compartimento intraluminale.*

Rispetto alla versione precedente della camera di coltura è stata mantenuta la struttura del telaio portavaso, composta da due sponde laterali e da un elemento di giunzione, e l'utilizzo delle cannule metalliche come elemento di connessione con il circuito idraulico. Per renderla compatibile con la presenza della camera interna, la lunghezza del telaio portavaso è stata ridotta, fino a poter calzare segmenti di vena di lunghezza massima pari a 5 cm. È stata, invece, mantenuta la presenza, nella parte inferiore del telaio, di un foro filettato di diametro pari a 5.5 mm, per l'alloggiamento di connettori in polipropilene, e la presenza di fori sulle sponde laterali per l'incollaggio delle alette metalliche necessarie per l'ancoraggio della vena mediante *vessel loop*. A livello del telaio, in sostituzione alla precedente guida (Figura 3.10), è stata introdotta una struttura "a pettine" che funge da guida per le cannule metalliche e aumenta ulteriormente la rigidezza del telaio (Figura 3.17). Questa modifica si è resa necessaria, in quanto, nella versione del telaio portavaso per la camera bicompartimentale la distanza tra le due sponde laterali è ridotta e, per motivi di ingombro, le cannule metalliche sono posizionate posteriormente rispetto alle sponde laterali e non più tra esse, come avveniva nel caso della camera monocompartimentale.

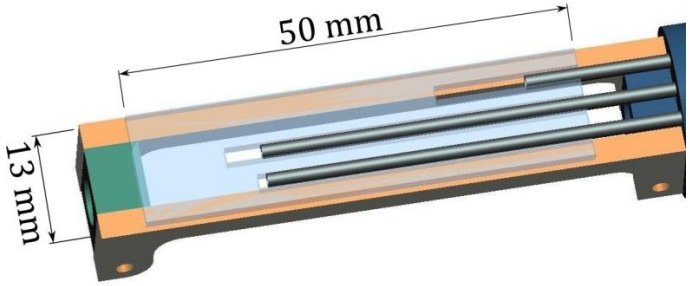


Figura 3.17 *Disegno CAD dell'elemento "a pettine" collocato in sede. Si nota come l'elemento, sia dimensionato in modo da inserirsi perfettamente tra le cannule metalliche.*

Anche in questa versione, l'accoppiamento tra telaio portavaso e tappo si realizza mediante incollaggio con colla acrilica.

È stato necessario apportare modifiche anche al disegno del tappo (Figura 3.18).

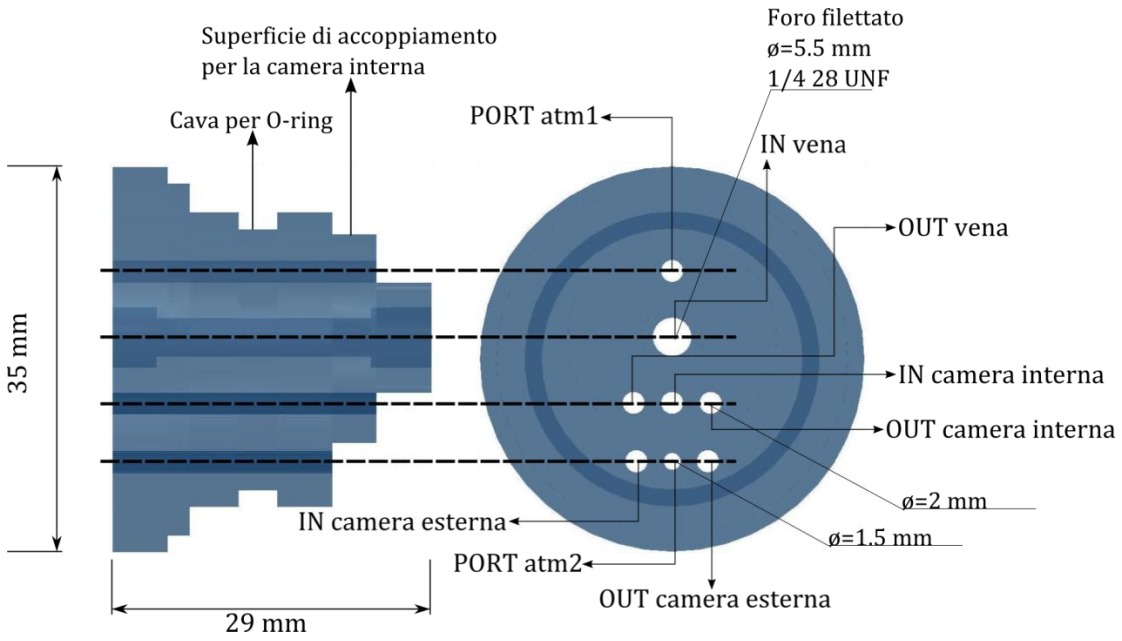


Figura 3.18 *Viste laterale e frontale del tappo, rappresentazione schematica della disposizione dei fori sulla superficie. IN vena e OUT vena rappresentano l'ingresso e l'uscita del medium dalla vena; IN camera interna e OUT camera interna rappresentano l'ingresso e l'uscita del medium dalla camera interna; IN camera esterna e OUT camera esterna rappresentano l'ingresso e l'uscita del medium dalla camera esterna; PORT atm 1 e 2 rappresentano i port per il mantenimento della pressione atmosferica rispettivamente nella camera interna e nella camera esterna. Sono inoltre evidenziate la cava per l'O-ring e la superficie di accoppiamento per la camera interna.*

Nello specifico è stato necessario introdurre due nuovi accessi per l'ingresso e l'uscita del medium compreso nell'intercapedine tra la camera interna e la camera esterna (IN camera esterna e OUT camera esterna) ed un nuovo accesso (PORT atm2) per mantenere a pressione atmosferica, mediante filtro HEPA, questo ambiente. Le dimensioni del foro per il secondo PORT atm sono ridotte per renderle compatibili con la presenza degli altri fori; è stata, quindi, utilizzata una cannula da 16 G con attacco luer per il posizionamento del filtro HEPA. Sono presenti, inoltre, due accessi per la camera interna (IN camera interna e OUT camera interna), due accessi per l'ingresso e l'uscita del vaso (IN vena e OUT vena) e un port per il mantenimento della pressione atmosferica nella camera interna (PORT atm1). L'introduzione di due nuovi accessi sul tappo e la presenza della camera interna ha reso necessario operare un decentramento, rispetto all'asse del tappo, del foro di accesso al vaso. In corrispondenza dell'accesso al vaso, nella parte interna del tappo è stata realizzata una filettatura per l'inserimento del connettore in polipropilene necessario per

l'alloggiamento del vaso. Come nella versione monocompartimentale della camera di coltura, sono stati scelti due tipi di connettori intercambiabili con diverso diametro interno (Codice S210-6, con diametro interno 1.6 mm e Codice S220-6, con diametro interno 2.25 mm, Value Plastics) per alloggiare vasi con lumi differenti.

La camera interna è stata realizzata a partire da un siringa da 20 ml (Pic Solution, Artsana S.p.a., Grandate, Italia); tagliata alla lunghezza desiderata, pari a 8 cm, privata dell'ago e tappata incollando un cappuccio in materiale plastico. Questa scelta è stata dettata dalla mancata reperibilità di un oggetto *disposable* che presentasse le caratteristiche dimensionali ricercate. La siringa presenta, invece, un diametro interno sufficiente per l'inserimento del telaio portavaso e al contempo uno spessore limitato che consente di ottenere un volume sufficiente dell'intercapedine tra la camera interna e la camera esterna, che costituisce il reservoir del compartimento intraluminale. Nella parte superiore della siringa è stato realizzato un foro di diametro pari a 4 mm (Figura 3.19); questo foro, definito troppo pieno consente che, in condizioni di esercizio, in caso di aumento eccessivo del volume nella camera interna, a causa di perdite o permeazioni di medium attraverso la parete del vaso, il terreno venga raccolto nella camera esterna, lasciando, così, pressoché inalterati i volumi nei due compartimenti.

Figura 3.19 Foro "troppo pieno", realizzato nella parte superiore della camera interna.

Il posizionamento della camera interna avviene ad incastro nella parte interna del tappo, dimensionata appositamente al fine di creare interferenza con il diametro interno della siringa. Infine, l'accoppiamento tra il complesso tappo-telaio e il tubo falcon da 50 ml, che funge da camera esterna, è realizzato mediante un O-ring in silicone posizionato nell'apposita cava realizzata sul tappo (Figura 3.18).

In questa versione della camera di coltura sono presenti due ambienti separati, che vanno a costituire i reservoir di due circuiti idraulici distinti; il medium presente

nell'intercapedine tra la camera interna e la camera esterna alimenta il circuito di stimolazione e scorre dunque all'interno del vaso, il medium presente nella camera interna, e cioè all'esterno del vaso, è, invece, destinato ad essere ricircolato e deossigenato. In Figura 3.20 è riportato un dettaglio della camera assemblata in cui si riescono a distinguere la camera interna, che costituisce il compartimento extra-avventiziale, e la camera esterna, che costituisce il reservoir per il compartimento intraluminale.

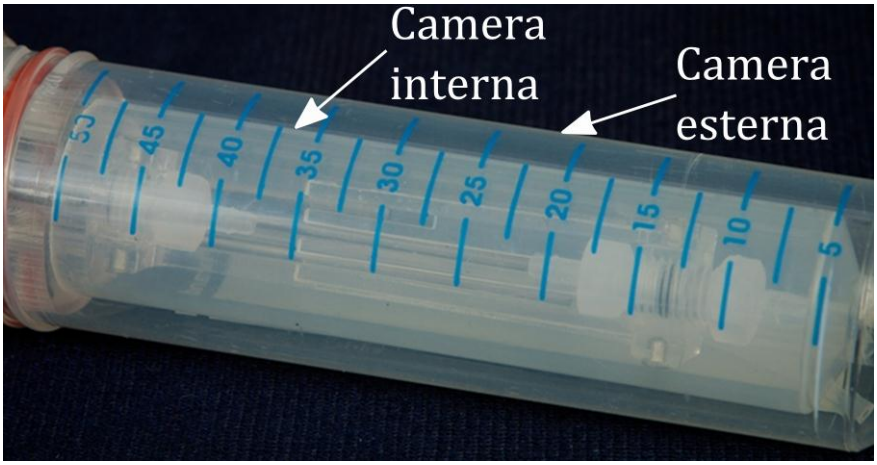


Figura 3.20 *Fotografia del dettaglio delle camere interne ed esterna e dell'intercapedine tra esse.*

3.3.1.2 Realizzazione del prototipo bicompartimentale

Il tappo è stato realizzato mediante la fresa a controllo numerico Modela MDX-40, partendo da un blocco rettangolare di PMMA; per la realizzazione della cava dell' O-ring si è ricorsi all'impiego del tornio parallelo. Gli elementi del telaio portavaso sono, invece, stati realizzati con il laser a CO_2 VersaLaser VLS 2.30, partendo da lastre in PMMA di spessore pari allo spessore finale desiderato (pari cioè a 3 mm per le sponde laterali del telaio, a 6 mm per l'elemento di giunzione del telaio e 1.5 mm per l'elemento "a pettine").

In Figura 3.21 è riportata una fotografia del prototipo completo: tappo e telaio portavaso, con tubi e filtri HEPA correttamente posizionati, camera interna e camera esterna.

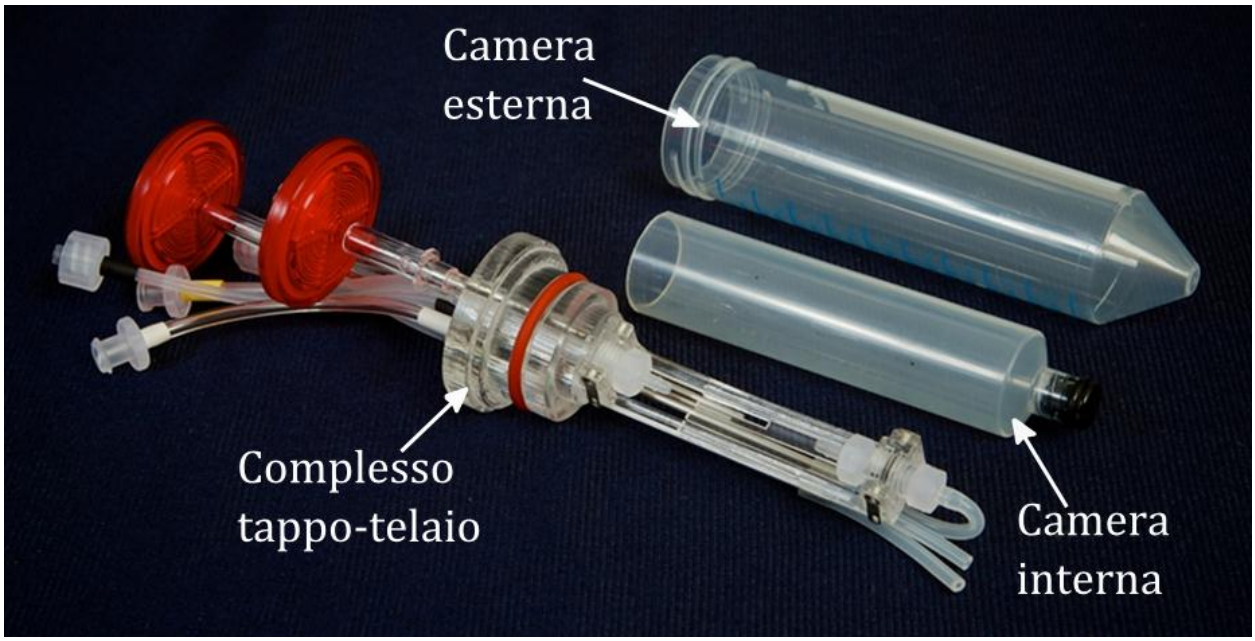


Figura 3.21 *Fotografia del complesso tappo-telaio, della camera interna e della camera esterna. Si notano, a livello del complesso tappo-telaio, i filtri HEPA per il mantenimento della pressione atmosferica all'interno dei due compartimenti e i tubi per la connessione dei circuiti idraulici del sistema di stimolazione e di deossigenazione.*

3.3.1.3 Progettazione e realizzazione del supporto

Al fine di rendere il sistema compatto e maneggevole all'interno dell'incubatore, durante il periodo di coltura, è stata realizzata una struttura di supporto in grado di alloggiare la camera e alcuni elementi del circuito di stimolazione. Questo supporto è stato progettato mediante il software CAD 3D Pro/ENGINEER Wildfire 4.0 (Parametric Technology Corporation, PTC) e realizzato a partire da lastre di PMMA con il laser a CO_2 VersaLaser VLS 2.30. Il supporto consente l'alloggiamento di due camere di coltura, con i rispettivi trasduttori di pressione e di un elettrovalvola; inoltre nella parte posteriore sono state posizionate due pinze per vincolare la camera di *compliance* (Figura 3.22).

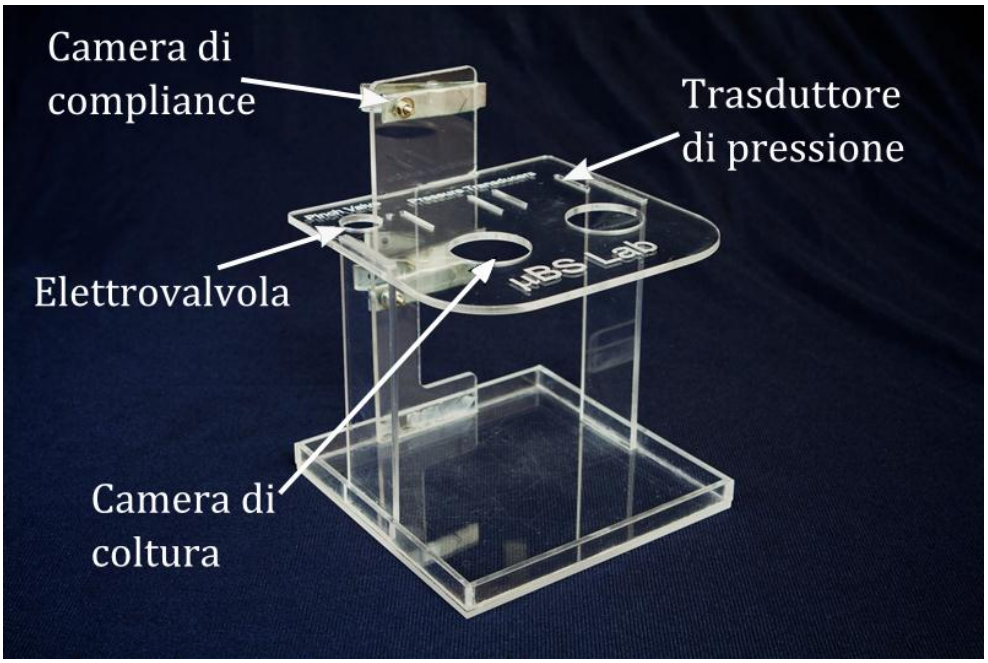


Figura 3.22 *Struttura di supporto; si distinguono gli alloggiamenti per le camere di coltura, per i trasduttori di pressione, per l'elettrovalvola e, nella parte posteriore, le pinze per vincolare la camera di compliance.*

3.3.2 Progettazione e realizzazione del circuito di deossigenazione

La progettazione e la realizzazione del circuito di deossigenazione sono necessarie al fine di riprodurre le condizioni ematochimiche del tessuto presente fisiologicamente all'esterno del vaso. L'obiettivo del sistema realizzato è di abbassare al 5% i livelli di concentrazione di ossigeno del medium nella camera interna, che delimita il compartimento extra-avventiziale del vaso in coltura. Il circuito di deossigenazione risulta composto da due elementi:

- un deossigenatore, dimensionato al fine di ottenere la concentrazione di ossigeno in uscita desiderata, come sarà discusso nel paragrafo 3.3.2.1.1;
- un sistema pompante per la movimentazione del medium, la cui portata di ricircolo è stata scelta sulla base di un modello matematico che sarà descritto nel paragrafo 3.3.2.1.2.

Come sistema pompante è stata impiegata una pompa peristaltica, in particolare, la pompa Watson-Marlow 323Du (Watson Marlow Group), con testa pompante 314D a quattro rulli (Watson Marlow) che soddisfa la necessità di mantenimento della sterilità (Figura 3.23). Il tubo sottopompa utilizzato è in PharMed® (Carlo Erba Reagenti) con diametro interno pari a 1.6 mm e spessore della parete pari a 1.6 mm.

Figura 3.23 *Fotografia della pompa peristaltica Watson Marlow 323Du con testa pompante 314D.*

La circuiteria di connessione è stata realizzata mediante tubi in silicone Platinum Cured (Cole Parmer Instrument Company) di diametro interno e spessore della parete pari a 0.8 mm, biocompatibili e adatti a colture di tessuti, inseriti in tubi in PVC (Tygon® R-3603, Saint Gobain Performance Plastics) di diametro interno pari a 1.4 mm e spessore della parete pari a 0.8 mm, poco permeabili all'ossigeno. Questa scelta consente di ottenere complessivamente un circuito idraulico a bassa permeabilità all'O_2 e contemporaneamente adatto per colture di tessuto biologico.

In Figura 3.24 è riportato uno schema del circuito; si può notare come sia stato mantenuto il circuito per la stimolazione del vaso preesistente.

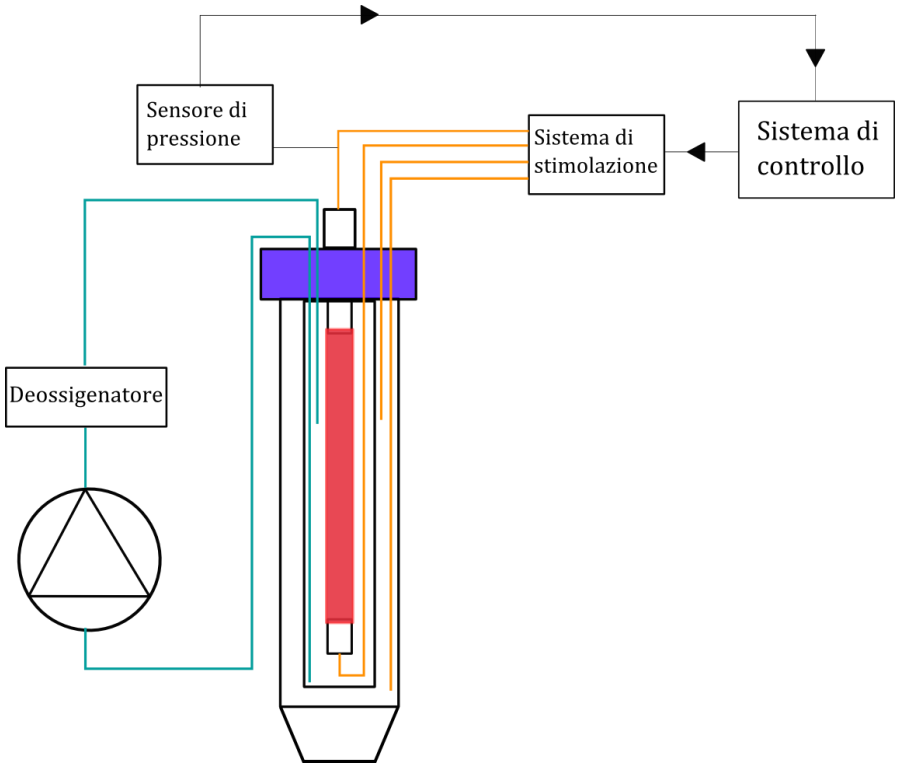


Figura 3.24 *Schematizzazione del sistema di coltura; si distinguono la camera di coltura bicompartimentale, il circuito per la deossigenazione (in azzurro), il circuito di stimolazione (in arancione) e il sistema di controllo (in nero).*

3.3.2.1 Dimensionamento del circuito di deossigenazione

Al fine di soddisfare la specifica di ingombro ridotto, di limitare le perdite di carico e, al contempo, ottenere il risultato desiderato in termini di pressione concentrazione di ossigeno del medium all'esterno del vaso è stato necessario definire un opportuno dimensionamento del circuito di deossigenazione. L'obiettivo è stato determinare la lunghezza del tubo in silicone all'interno del deossigenatore, il valore della portata di ricircolo del fluido e la composizione della miscela di gas immessa nel deossigenatore, tenendo in considerazione che l'intero sistema di coltura è destinato ad essere utilizzato all'interno di un incubatore, caratterizzato da un'atmosfera controllata in termini di temperatura, pari a 37°C, umidità e concentrazione di CO_2, pari al 5%, in cui la concentrazione di O_2 risulta essere del 18.6%, che corrisponde ad una pressione parziale di circa 140 mmHg. Nel modello è stata però imposta come concentrazione di ossigeno nell'ambiente esterno un valore di cO_2 pari al 21%, che corrisponde al valore atmosferico, con il quale il medium si trova in equilibrio all'inizio della coltura. In Figura 3.25 è riportato uno schema in cui vengono identificate le grandezze che compariranno nella trattazione del modello di deossigenazione.

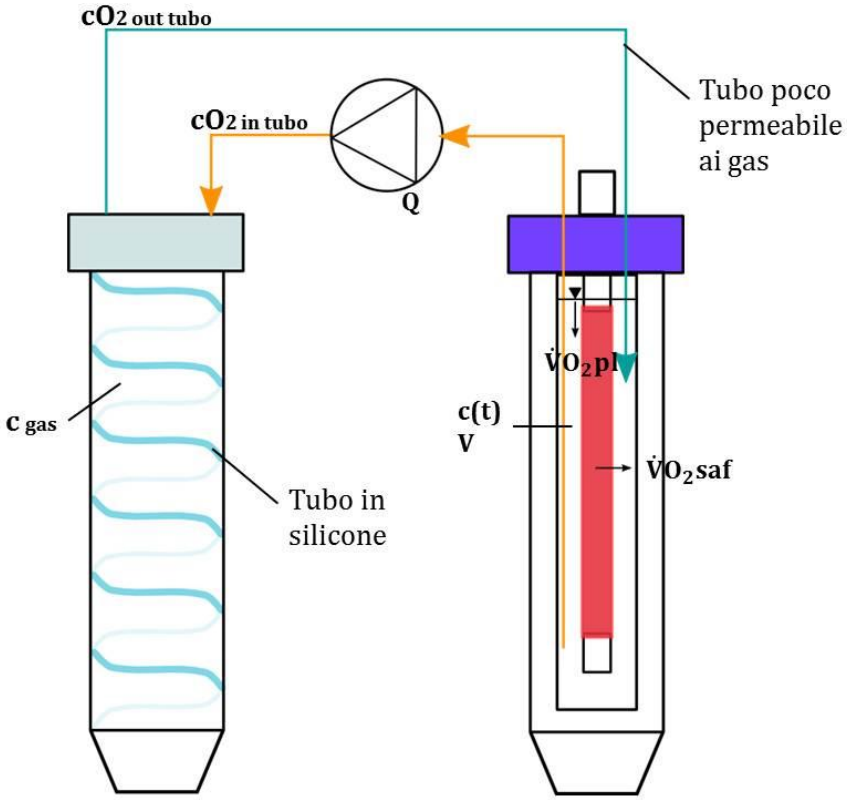


Figura 3.25 *Schema della camera di coltura e del deossigenatore dove si possono identificare le grandezze che verranno introdotte nella trattazione seguente.*

Il primo step del dimensionamento delle grandezze caratteristiche del sistema di deossigenazione è consistito nel determinare la lunghezza del tubo in silicone all'interno del modulo deossigenante isolato dalla camera di coltura. In questa analisi è stata determinata la lunghezza L del tubo necessaria affinché il fluido, che in ingresso al deossigenatore è caratterizzato da una concentrazione di O_2 (cO_{2in_tubo}) in equilibrio con l'atmosfera, in uscita dal deossigenatore raggiunga il valore di concentrazione di O_2 (cO_{2out_tubo}) desiderato (che corrisponde al 5% di O_2). Nel modello è stato imposto un ambiente gassoso caratterizzato da concentrazione di O_2 (c_{gas}) nulla e L è stata valutata al variare della portata (Q) del fluido che scorre all'interno. L'analisi ha portato all'identificazione di tre possibili valori di L. Il dimensionamento della lunghezza del tubo in silicone è descritto in dettaglio nel paragrafo 3.3.2.1.1.

Successivamente, è stato valutato il comportamento del deossigenatore associato alla camera di coltura; in particolare il compartimento extra-avventiziale è stato rappresentato come un modello compartimentale aperto caratterizzato da un volume costante (V) e da una concentrazione di O_2 ($c(t)$) variabile nel tempo in funzione della portata Q e della lunghezza L. Con questo modello è stato studiato l'andamento della $c(t)$ durante la fase di transitorio necessaria al raggiungimento del valore di equilibrio desiderato; in particolare, per ognuno dei tre valori di L selezionati precedentemente è stato valutato l'effetto di diverse Q sull'andamento di $c(t)$. È stata quindi stimata, per ogni valore di L, una τ limite, corrispondente al tempo minimo della durata del transitorio; dalle τ determinate è stato infine ricavato il corrispondente valore di Q limite, oltre il quale un ulteriore aumento non comporta effetti significativi sul comportamento del sistema. Da questa analisi sono emersi, quindi, per ogni valore di L le rispettive τ e Q che determinano le condizioni di lavoro di massima efficienza del sistema. La descrizione del comportamento del sistema durante il transitorio è riportata nel paragrafo 3.3.2.1.2.

Nell'ultima fase, è stato studiato il comportamento del sistema in fase di regime; in particolare è stata valutata la c_{gas} da imporre al fine di mantenere la $c(t)$ costante al valore desiderato (che corrisponde al 5% di O_2). Il compartimento extra-avventiziale è stato, quindi, rappresentato come un modello compartimentale ad anello chiuso di volume V, in cui $c(t)$ dipende da Q, L e dalla diffusione di O_2 attraverso la parete del vaso ($\dot{V}_{O_2}saf$) e dal pelo libero ($\dot{V}_{O_2}pl$). Per ogni valore di L è stata quindi calcolata la pO_2 da imporre al lato gas, al variare della Q di ricircolo, al fine di mantenere constante la $c(t)$ all'interno del

compartimento extra-avventiziale. La descrizione del comportamento durante il transitorio è riportata nel paragrafo 3.3.2.1.3.

3.3.2.1.1 Modello della deossigenazione

Nel modello realizzato il tubo in silicone rappresenta l'elemento attraverso cui si realizza lo scambio. Nell'ipotesi di comportamento ideale la concentrazione di O_2 nel medium in uscita (cO_{2out_tubo}) eguaglia la concentrazione di O_2 presente nel deossigenatore (c_{gas}); tuttavia, nel modello sviluppato, i tubi sono considerati scambiatori reali, per cui la $cO_{2out\ tubo}$ non raggiungerà mai il valore imposto dal lato gas ma vi tenderà con andamento asintotico (Figura 3.26).

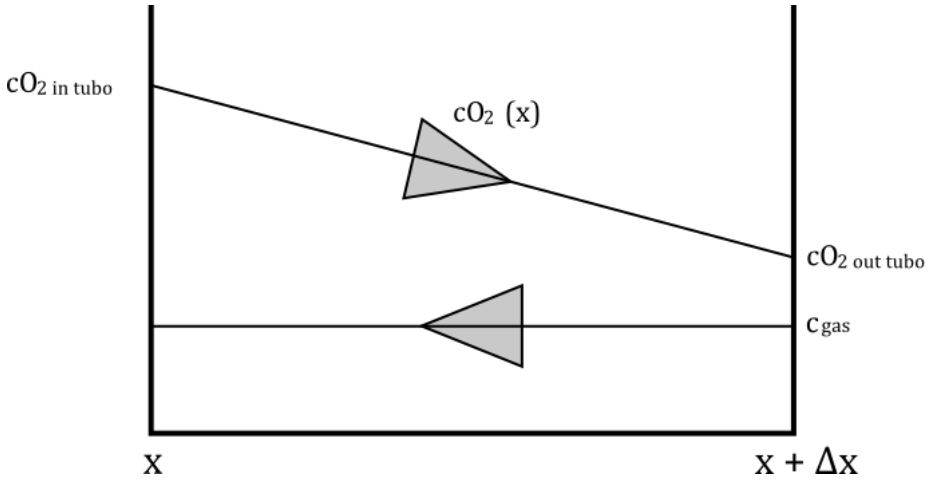


Figura 3.26 *Andamento della concentrazione di ossigeno nel deossigenatore c_{gas}, costante, e nel medium $cO_2(x)$, in funzione della coordinata x misurata lungo l'asse del tubo in silicone.*

La cO_{2out_tubo} sarà, quindi, considerata come una variabile di progetto e il suo valore dipenderà dalla portata di ricircolo del medium e dalla lunghezza del tubo all'interno del deossigenatore, come si può osservare in Figura 3.26 in cui la cO_2 è funzione della lunghezza del tubo *x*. Lo scambio volumetrico di ossigeno attraverso la parete del tubo in silicone è guidata dalla differenza di concentrazione di O_2 tra il gas nel deossigenatore (c_{gas}) e il medium all'interno del tubo $cO_2\ (x)$. La superficie di scambio dei tubi è stata calcolata come il prodotto tra la lunghezza *x* e la circonferenza media logaritmica dei tubi *W*, definita come:

$$W = \pi \frac{D_{ext} - D_{in}}{ln \frac{D_{ext}}{D_{in}}} \quad (1)$$

in cui D_{in} e D_{ext} rappresentano, rispettivamente, il diametro interno ed esterno del tubo.

Lo scambio volumetrico di O_2 dipende, inoltre, dal coefficiente globale di scambio di massa U, costituito dall'inverso della somma delle resistenze incontrate dall'ossigeno nel passaggio dall'interno all'esterno del tubo. Questi elementi resistivi sono rappresentati dalla resistenza convettiva determinata dalla presenza del medium all'interno del tubo (R_{int}), dalla resistenza diffusiva data dalla parete del tubo (R_{tubo}) e dalla resistenza convettiva determinata dal gas all'esterno del tubo (R_{ext}) (Figura 3.27).

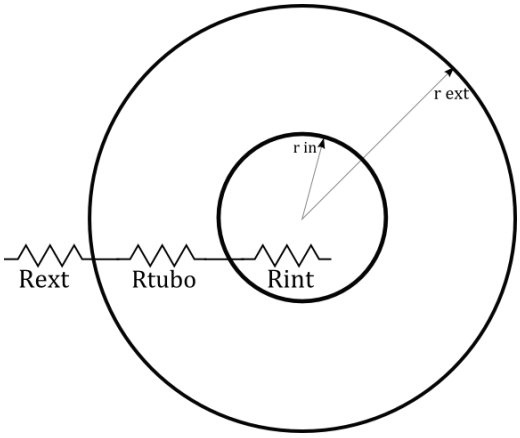


Figura 3.27 *Rappresentazione schematica delle resistenze allo scambio di O_2. R_{int} è la resistenza convettiva determinata dalla presenza di medium all'interno del tubo, R_{tubo} è la resistenza diffusiva determinata dalla parete del tubo, R_{ext} è la resistenza convettiva data dalla presenza di gas all'esterno del tubo; r_{in} e r_{ext} sono, rispettivamente, il raggio interno ed il raggio esterno del tubo.*

Le resistenze sono state calcolate sulla base del modello pubblicato da Orr *et al.* [41], in cui si studia il dimensionamento di un tubo in silicone al fine di garantire l'ossigenazione del medium di coltura. In particolare:

$$R_{int} = \frac{H}{k_i} \quad (2)$$

$$R_{tubo} = \frac{t_m W_i}{\rho_{STP} P_m W} \quad (3)$$

$$R_{ext} = \frac{RTW_i}{k_e W_e} \tag{4}$$

dove:

H = 0.74 mmHg/μM è la costante di Henry per l'ossigeno;

ρ_{STP} = 4.46 10^{-5} mol/cm^3 è la densità dell'O_2 in condizioni standard di temperatura e pressione;

P_m = 7.96 10^{-9} cm^2/s mmHg è la permeabilità del tubo in silicone all'ossigeno;

t_m è lo spessore della parete del tubo in silicone;

W_i è la circonferenza interna del tubo in silicone;

W_e è la circonferenza esterna del tubo in silicone;

W è la circonferenza media logaritmica del tubo, già definita in eq (1);

k_i è il coefficiente di scambio locale interno;

k_e è il coefficiente di scambio locale esterno;

R = 8.314 J/mol K è la costante dei gas;

T = 310 K è la temperatura all'interno dell'incubatore.

Per il calcolo di k_i e k_e si rimanda alla trattazione di Orr [41]. Il coefficiente globale di scambio di massa può essere calcolato come:

$$U = \frac{1}{R_{int} + R_{tubo} + R_{ext}} \tag{5}$$

Lo scambio di ossigeno attraverso il tubo può essere, quindi, calcolato attraverso un bilancio di massa:

$$\dot{V}_{tubi} = UW\Delta x\left(c_{gas} - cO_2\left(x\right)\right) \tag{6}$$

Dividendo per Δx e portandosi al limite per $\Delta x \to 0$, operando una serie di sostituzioni, separazioni di variabili ed integrazioni si ottiene la seguente equazione, risolta in funzione di $cO_2(x)$, ricavata dalla trattazione di Orr:

$$cO_2(x) = c_{gas} - \left(c_{gas} - cO_{2in\_tubo}\right) \exp\left(-\frac{WHU}{Q}x\right) \tag{7}$$

da cui si ricava *x*:

$$x = -ln\left(\frac{c_{gas} - cO_2(x)}{c_{gas} - cO_{2in\_tubo}}\right)\frac{Q}{UWH} \tag{8}$$

Detta L la lunghezza totale del tubo deossigenante, variabile di progetto, si avrà che $cO_2(L)=cO_{2out\_tubo}$; pertanto, *L* può essere determinata in base alla portata di ricircolo imposta e al valore di cO_{2out_tubo} desiderato:

$$L = -ln\left(\frac{c_{gas} - cO_2(L)}{c_{gas} - cO_{2in\_tubo}}\right)\frac{Q}{UWH} \tag{9}$$

In Figura 3.28 è riportato l'andamento di *L*, per un tubo con diametro interno e spessore pari a 0.8 mm, al variare della portata di ricircolo del medium, parametrizzato per valori diversi della cO_{2out_tubo} e avendo imposto c_{gas} pari a 0 mmHg; i valori sono stati convertiti in pressioni parziali di O_2, mediante la legge di Henry, al fine di renderne più immediata la comprensione.

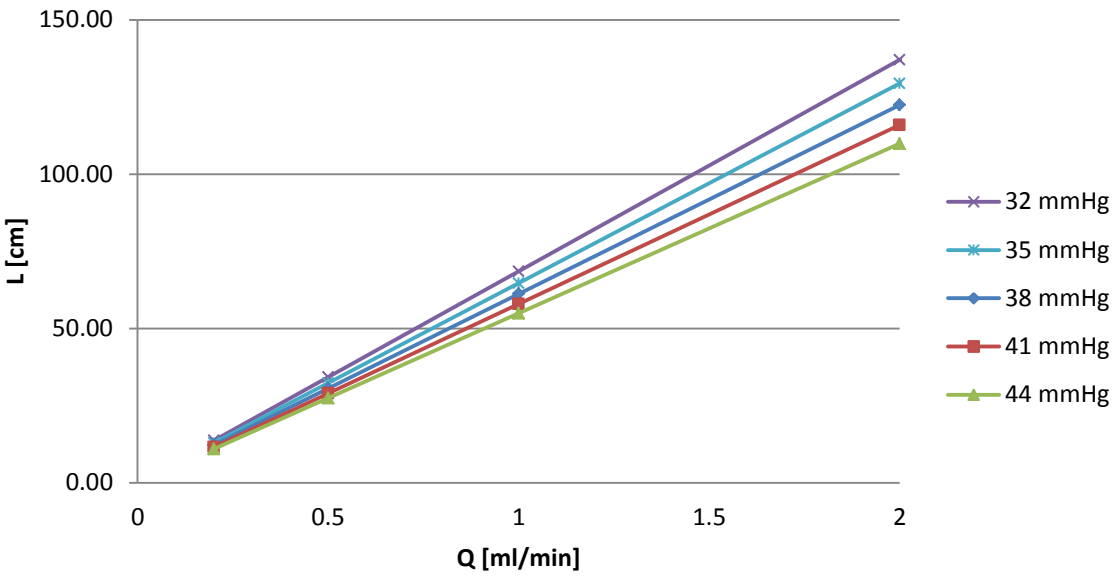


Figura 3.28 *Andamento della lunghezza del tubo in silicone in funzione della portata di ricircolo del medium per diversi valori di* cO_{2out_tubo}.

Sulla base dei dati emersi dal dimensionamento si evince che all'aumentare della portata aumenta la lunghezza del tubo necessaria e viceversa. La lunghezza del tubo rappresenta il limite più significativo ed è stato scelto come principale elemento progettuale. Al fine di mantenere le perdite di carico contenute e di limitare l'ingombro ed il volume di priming sono state scelte tre lunghezze possibili del tubo del deossigenatore, rispettivamente 20, 40 e 80 cm, per completare la caratterizzazione sulla base di due modelli compartimentali dello scambio di massa nel compartimento extra-avventiziale, durante la fase di transitorio e a regime.

3.3.2.1.2 Modello del comportamento durante il transitorio

Considerando le tre possibili lunghezze del tubo, è stato, quindi, modellizzato il comportamento del sistema durante la fase di transitorio, al fine di valutare le tempistiche necessarie per il raggiungimento dell'equilibrio, in termini di concentrazione di ossigeno, tra il volume di medium e il gas. A tal fine ci si è avvalsi di un modello compartimentale, esemplificato in Figura 3.29, relativo all'andamento della concentrazione di ossigeno nella camera interna della camera di coltura, che delimita il compartimento extra-avventiziale da deossigenare.

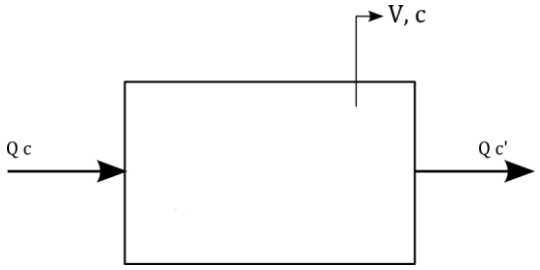


Figura 3.29 *Modello compartimentale per lo studio del comportamento del sistema durante la fase di transitorio, caratterizzato da un volume V costante e da una concentrazione di O_2 c variabile nel tempo; Q rappresenta la portata di ricircolo del fluido all'interno del compartimento.*

Il bilancio di massa relativo al compartimento può essere espresso come:

$$V\frac{dc}{dt} = Q\left(c' - c\right) \tag{10}$$

in cui *c'*, come mostrato in Figura 3.29, è la concentrazione di O_2 in uscita dal compartimento.

Esprimendo l'equazione (7) in termini di concentrazioni, si ottiene:

$$c' = c\left(L\right) = c_{gas} - \left(c_{gas} - c\right)\exp\left(-\frac{UWH}{Q}L\right) \tag{11}$$

che può essere sostituita nella (10) per ottenere la seguente equazione differenziale omogenea a coefficienti costanti:

$$\frac{dc}{dt} - \frac{Q}{V}\left(c_{gas} - \left(c_{gas} - c\right)\exp\left(-\frac{UWH}{Q}L\right) - c\right) = 0 \tag{12}$$

Operando una serie di sostituzioni, separazioni di variabili ed integrazioni si ottiene la seguente equazione, risolta in funzione di *c(t)*, avendo imposto come condizione iniziale che $c=c_0$, per $t=0$:

$$c\left(t\right) = c_{gas} + \left(c_0 - c_{gas}\right)exp - \left(\frac{Q}{V}\left(1 - exp\left(-\frac{UWH}{Q}L\right)\right)\right)t \tag{13}$$

In Figura 3.30-a è riportato l'andamento di *c(t)*, per un tubo con diametro interno e spessore pari a 0.8 mm e lunghezza pari a 20 cm; esso è parametrizzato per valori diversi della portata di ricircolo di un volume di medium pari a 20 ml, avendo imposto la concentrazione di ossigeno nel gas (c_{gas}) pari a 0 mmHg. Nella Figura 3.30-b e Figura 3.30-c sono riportati gli stessi dati per un tubo lungo, rispettivamente 40 e 80 cm. Nel modello c_0 è stata imposta pari a 0.00028 mmol/ml, che corrispondono ad un valore di concentrazione di O_2 del 21%.

Questa modellizzazione ha evidenziato, per tutte le lunghezze del tubo analizzate, la presenza di un valore limite di portata, oltre la quale non si hanno variazioni nelle tempistiche di raggiungimento dell'equilibrio. È stata quindi individuata la τ limite del sistema (τ_∞), per le tre lunghezze, da cui è stata ricavata la τ massima accettabile ($\bar{\tau}$), ammettendo un errore del 10% rispetto a τ_∞.

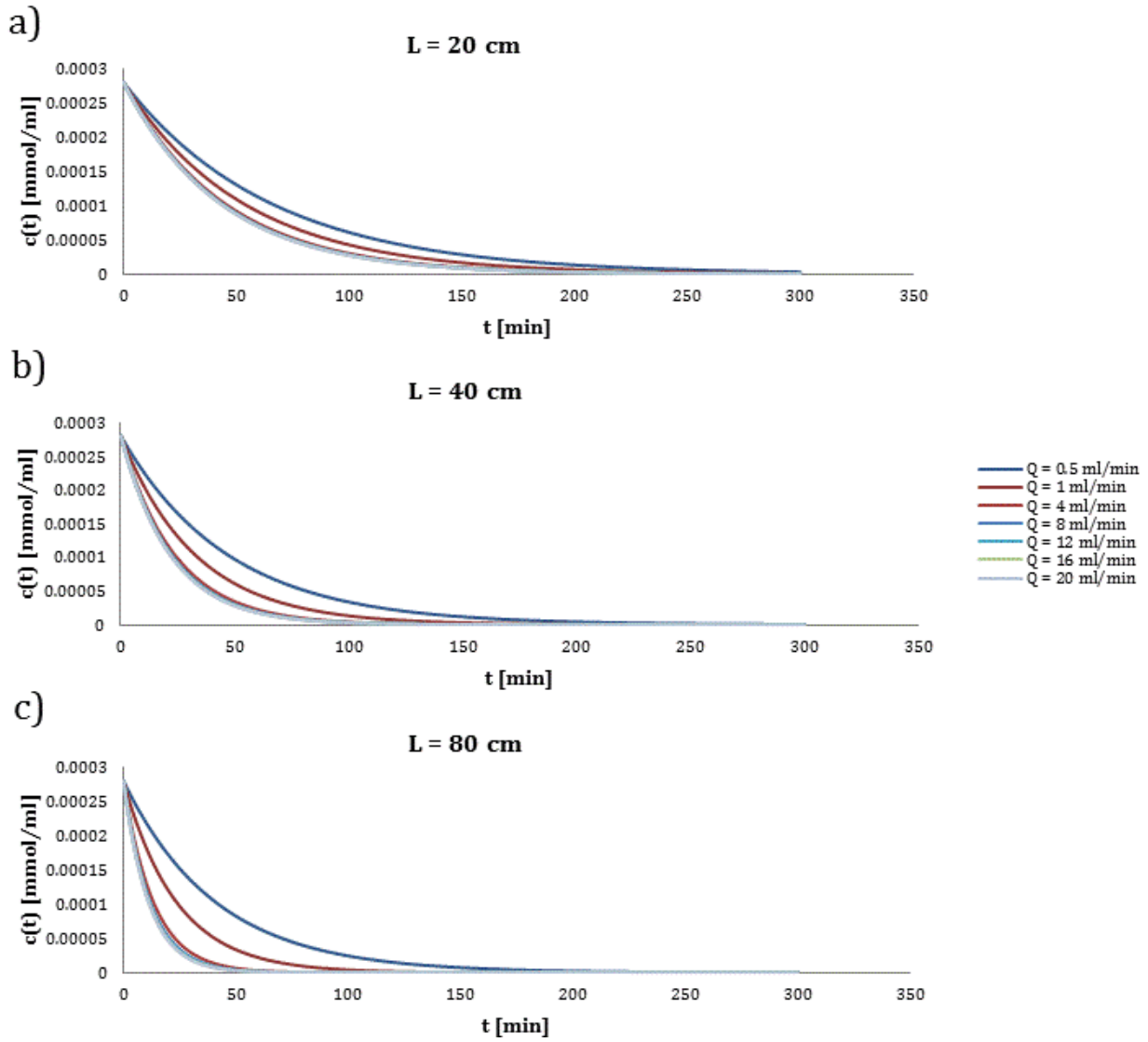


Figura 3.30 *Andamento della concentrazione di O_2 nel tempo, al variare della portata di ricircolo, per un tubo in silicone lungo 20 cm (a), 40 cm (b) e 80 cm (c), collocato in un ambiente gassoso composto da azoto puro.*

Applicando la forma generale della soluzione di un'equazione differenziale omogenea a coefficienti costanti:

$$c(t) = c_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \tag{14}$$

all'equazione (13), soluzione della (12), si ottiene che:

$$\tau = \frac{V}{Q}\left(1 - exp\left(-\frac{UWH}{Q}L\right)\right)^{-1} \tag{15}$$

da cui, per Q→∞:

$$\tau_{\infty} = \lim_{Q\to\infty} \frac{V}{Q}\left(1-exp\left(-\frac{UWH}{Q}L\right)\right)^{-1} = \frac{V}{LUWH} \tag{16}$$

È stata quindi determinata $\bar{\tau}$ come:

$$\bar{\tau} = 1.1\tau_{\infty} \tag{17}$$

In Figura 3.31 è riportato l'andamento di τ_{∞} e di $\bar{\tau}$ al variare della lunghezza del tubo.

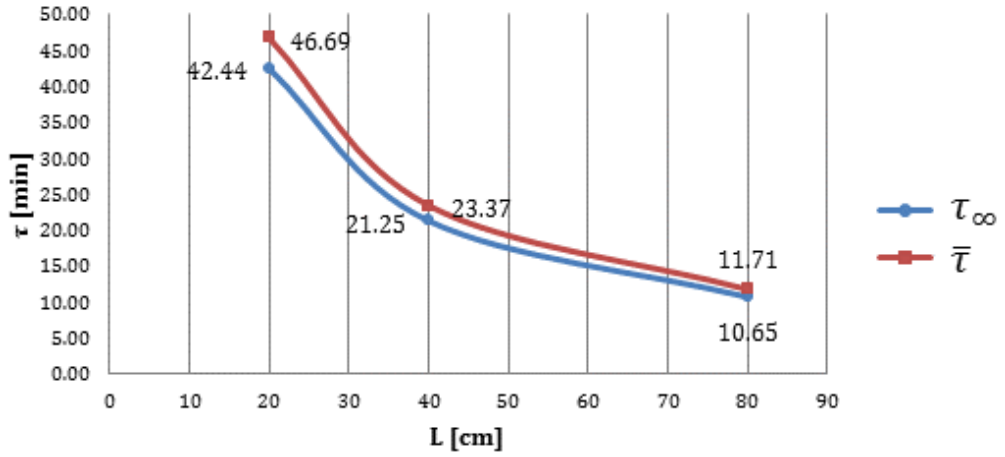


Figura 3.31 *Andamento di $\bar{\tau}$, in rosso, e di τ_{∞}, in blu, al variare della lunghezza del tubo.*

Dalle $\bar{\tau}$ determinate, a partire dall'equazione (15), mediante alcuni passaggi matematici, sono state calcolate le rispettive $\bar{Q}$, oltre le quali non si hanno effetti significativi nelle tempistiche di raggiungimento dell'equilibrio; i risultati sono riportati in Figura 3.32. Come si può osservare dal grafico, all'aumentare della lunghezza del tubo aumenta il valore della portata di ricircolo da imporre e diminuisce la tempistica del fenomeno.

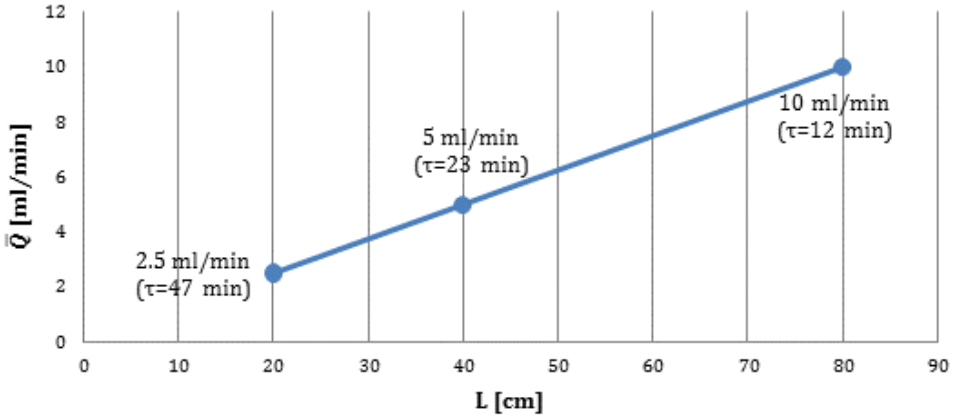


Figura 3.32 *Andamento di $\bar{Q}$ al variare della lunghezza del tubo.*

3.3.2.1.3 Modello del comportamento a regime

Considerando le tre possibili lunghezze del tubo è stato, infine, modellizzato il comportamento del sistema a regime, al fine di ottenere indicazioni sulla pO_2 da imporre lato gas per mantenere la pO_2 del sistema costante al valore di progetto, pari a 38 mmHg.

Questo modello è stato sviluppato tenendo in considerazione i contributi che influenzano il mantenimento dell'equilibro a regime; anche in questo caso è stato studiato un modello compartimentale della camera interna. Come si può notare in Figura 3.33, gli elementi che influenzano l'andamento della concentrazione nel compartimento sono: lo scambio di ossigeno attraverso la parete del vaso dall'interno verso l'esterno ($\dot{V}_{O_2}saf$), la diffusione di ossigeno dal pelo libero ($\dot{V}_{O_2}pl$) e il consumo di ossigeno da parte delle cellule del vaso ($\dot{V}_{O_2}$).

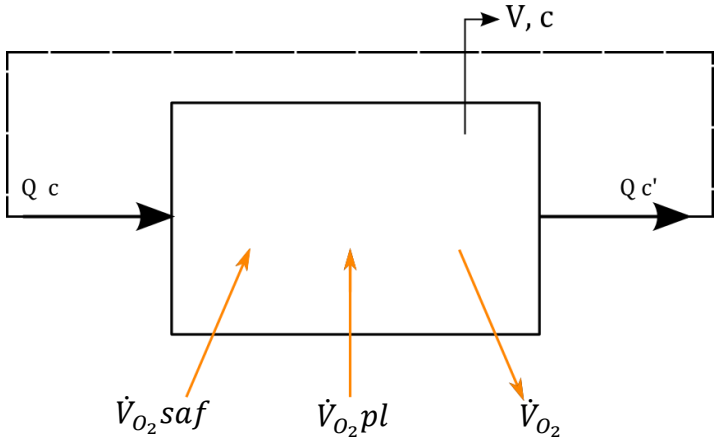


Figura 3.33 *Modello compartimentale per lo studio del comportamento del sistema durante la fase di regime; il compartimento è caratterizzato da un volume V costante e da una concentrazione di O2 c variabile nel tempo, Q rappresenta la portata di ricircolo del fluido all'interno del compartimento, $\dot{V}_{O_2}saf$, $\dot{V}_{O_2}pl$ e $\dot{V}_{O_2}$ rappresentano rispettivamente lo scambio di ossigeno attraverso la parete del vaso dall'interno verso l'esterno, la diffusione di ossigeno dal pelo libero e il consumo di ossigeno da parte delle cellule del vaso.*

I contributi sono stati valutati singolarmente e, infine, inseriti nel modello.
La diffusione dal pelo libero è stata calcolata applicando la prima legge di Fick, per cui:

$$\dot{V}_{O_2} pl = A_{pl} D \frac{\Delta c}{t_{pl}} \tag{18}$$

dove:
A_{pl} rappresenta l'area della sezione del pelo libero;
D è il coefficiente di diffusione dell'O_2 nel medium di coltura (pari a 2.18 10^{-5} cm^2/s);
Δc è la differenza di concentrazione di ossigeno tra l'aria e il medium;
t_{pl} è lo spessore dello strato di medium in cui avviene la diffusione.

In Figura 3.34 è riportato l'andamento di $\dot{V}_{O_2} pl$ all'aumentare dello spessore dello strato di fluido, si può notare come già per spessori molto ridotti l'effetto della diffusione attraverso il pelo libero sia trascurabile.

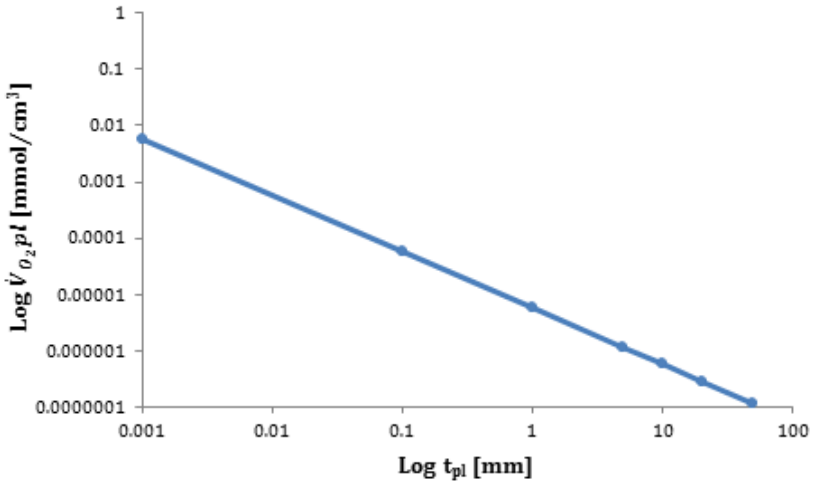


Figura 3.34 *Diffusione di ossigeno dal pelo libero all'aumentare dello spessore dello strato di fluido in cui avviene la diffusione; i valori sono riportati in scala logaritmica.*

La diffusione attraverso la parete del vaso è stata espressa attraverso la prima legge di Fick, come:

$$\dot{V}_{O_2} saf = A_{saf} D_{saf} \frac{\Delta c}{t_{saf}} \tag{19}$$

dove:

A_{saf} rappresenta l'area della superficie laterale del vaso, calcolata in base ai dati medi di diametro interno (pari a 3.5 mm), spessore (pari a 0.5 mm) e lunghezza (pari a 5 cm);

D_{saf} è il coefficiente di diffusione dell'O_2 attraverso la parete del vaso (pari a 2 10^{-6} cm^2/s [42]);

Δc è la differenza di concentrazione di ossigeno tra il medium che scorre all'interno del vaso e il medium all'esterno;

t_{saf} è lo spessore della parete del vaso.

Il contributo del consumo di O_2 da parte delle cellule del vaso $\dot{V}_{O_2}$ è, invece, stato trascurato in quanto rappresenta un elemento di sicurezza per l'obiettivo progettuale di rimuovere ossigeno dal medium di coltura.

Il modello compartimentale della camera può, quindi, essere scritto, in termini di bilancio di massa come:

$$V\frac{dc}{dt} = Q\left(c - c^{'}\right) - \dot{V}_{O_2} + \dot{V}_{O_2} saf + \dot{V}_{O_2} pl \tag{20}$$

In condizioni di regime si ha $\frac{dc}{dt} = 0$, quindi, dalla (20) si può ricavare che:

$$c' = c - \frac{\dot{V}_{O_2} - \dot{V}_{O_2} saf - \dot{V}_{O_2} pl}{Q} \tag{21}$$

in cui c rappresenta la concentrazione di ossigeno nel medium in ingresso alla camera, che coincide con il medium in uscita dal deossigenatore.

Applicando le condizioni di regime $\frac{dc}{dt} = 0$ alla (12) otteniamo che:

$$c_{\infty}(deossigenatore) = c_{gas} \tag{22}$$

ad indicare che in condizioni di regime il medium che scorre nel deossigenatore è, in termini di concentrazione di ossigeno, in equilibrio con il gas. c_{∞}(deossigenatore)

corrisponde alla concentrazione *c* dell'equazione (21), per cui, possiamo esprimere la (21) nel modo seguente:

$$c' = c_{gas} - \frac{\dot{V}_{O_2} - \dot{V}_{O_2} saf - \dot{V}_{O_2} pl}{Q} \tag{23}$$

Poiché il medium è continuamente ricircolato tra la camera e il deossigenatore, la (23) può essere sostituita alla *c* che compare nella (11) ottenendo un'espressione mediante cui determinare la concentrazione di ossigeno lato gas da imporre per mantenere la concentrazione di ossigeno lato medium desiderata durante la fase di regime; nel dettaglio, considerando di imporre il consumo cellulare $\dot{V}_{O_2} = 0$, come già detto, si ottiene che:

$$c_{gas} = \frac{c' - \left[c' + \frac{\Delta c}{Q} \left(\frac{A_{saf} D_{saf}}{t_{saf}} + \frac{A_{pl} D}{t_{pl}} \right) \right] \exp\left(- \frac{UWHL}{Q} \right)}{1 - \exp\left(- \frac{UWHL}{Q} \right)} \tag{24}$$

in cui *c'* corrisponde al valore ideale di concentrazione di O_2 a regime, pari a 4.9 10^{-5} mmol/ml, che equivale al 5% di concentrazione di ossigeno, e *Δc* corrisponde al delta di concentrazione di ossigeno che contrasta il raggiungimento del valore di concentrazione c_∞ ideale. In Figura 3.35 si può osservare l'andamento della variabile c_{gas} da imporre, al variare della portata di ricircolo all'interno del tubo in silicone; esso è stato parametrizzato per le tre lunghezze del tubo esaminate; il risultato è stato convertito in pressioni parziali di O_2, mediante la legge di Henry, al fine di renderne più immediata la comprensione.

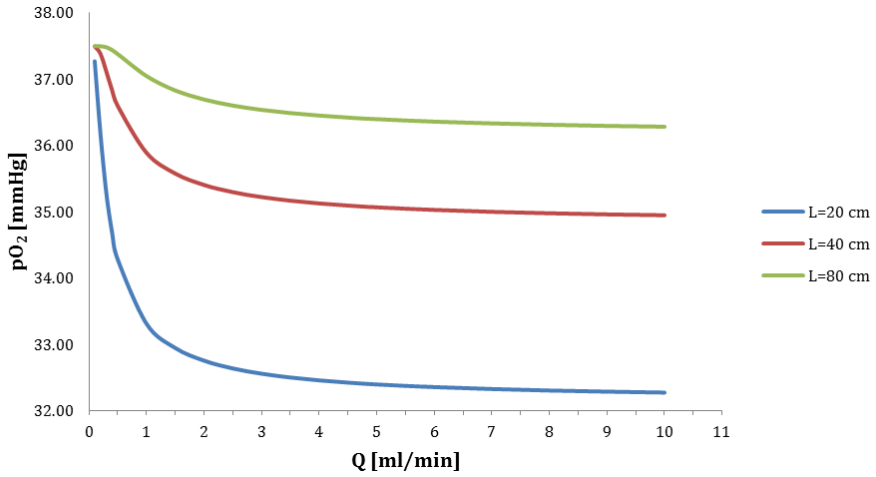


Figura 3.35 *Andamento della pressione parziale di ossigeno da imporre lato gas al variare della portata di ricircolo del medium.*

Analizzando i risultati emersi dalle modellizzazioni appena esposte è stato possibile osservare che, ognuna delle tre configurazioni ipotizzate per la lunghezza del tubo potrebbe essere adeguata. Tuttavia alcune considerazioni hanno spinto verso la scelta di utilizzare un tubo di lunghezza pari a 40 cm, imponendo la massima portata di ricircolo utile, pari cioè a 5 ml/min, che comporta l'imposizione lato gas di una pO_2 pari a 35 mmHg. Per quanto concerne le altre lunghezze valutate, invece, in primo luogo è stato scartato il tubo lungo 20 cm in quanto, in questa configurazione, lo scambio di ossigeno sarebbe stato meno efficace e avrebbe richiesto tempistiche maggiori di raggiungimento del valore di regime, con una τ pari circa a 50 minuti. D'altro canto, il confronto con l'equipe di biologi del LIT ha spinto ad evitare la scelta di tubi troppo lunghi che, nelle operazioni di montaggio sotto cappa, potrebbero essere difficilmente maneggiabili ed essere di intralcio. Inoltre, avendo scelto di lavorare alle massime portate utili del sistema, per ottenere massima efficienza dello scambio e minime tempistiche del raggiungimento del valore di regime, è stato tenuto in considerazione che la portata limite $\bar{Q}$, relativa ad un tubo di 80 cm è pari a 10 ml/min; questo valore è stato scartato per evitare di influenzare la risposta del campione biologico applicando shear stress eccessivi a livello dell'avventizia.

La soluzione progettuale scelta per mantenere il 5% di pO_2 nel compartimento extra-avventiziale consiste, quindi, nell'utilizzo di un tubo in silicone di lunghezza pari a 40 cm e diametro e spessore pari a 0.8 mm, al cui interno viene fatto ricircolare il fluido da deossigenare, mentre all'esterno un'atmosfera gassosa controllata guida l'estrazione di O_2 dal fluido. Durante la fase di transitorio il lato gas è composto esclusivamente da azoto, per massimizzare il ΔpO_2 che determina la deossigenazione del fluido che scorre all'interno del

tubo, con una portata pari a 5 ml/min; questa configurazione consente il raggiungimento della pO_2 obiettivo in circa 2 ore (5τ), tempo trascurabile rispetto alla durata complessiva di 7 giorni degli esperimenti con campioni biologici. In fase di regime, viene mantenuto il valore di equilibrio raggiunto fornendo al lato gas una miscela composta da azoto e aria in proporzione 3:1, controllata tramite flussimetri. La miscela gassosa risulta, quindi caratterizzata dal 4.6% di O_2 (35 mmHg) e consente di controbilanciare i fenomeni di diffusione di O_2 verso il compartimento extra-avventiziale, mantenendo una portata di ricircolo del fluido pari a 5 ml/min.

In seguito al dimensionamento del circuito si è passati, quindi, alla progettazione del deossigenatore vero e proprio; anche per questo elemento si è ricorsi all'impiego del software CAD 3D Pro/ENGINEER Wildfire 4.0 (Parametric Technology Corporation, PTC).

3.3.2.2 Progettazione del deossigenatore

Per la realizzazione di questo elemento è stato scelto di mutuare l'accoppiamento tappo – tubo falcon da 50 ml che si è dimostrato maneggevole, efficace e adatto ai volumi di esercizio ridotti. La deossigenazione si realizza mediante il passaggio del medium all'interno di un tubo in silicone Platinum Cured permeabile all'ossigeno, al cui esterno l'atmosfera è composta da una miscela di aria e azoto. Il disegno del deossigenatore è stato quindi concepito al fine di offrire due accessi per il lato medium e due accessi per il lato gas; inoltre, è stato realizzato un elemento su cui il tubo in silicone possa essere avvolto. In Figura 3.36 è riportato il disegno CAD del prototipo parzialmente assemblato. Per i disegni tecnici si faccia riferimento all'APPENDICE A.

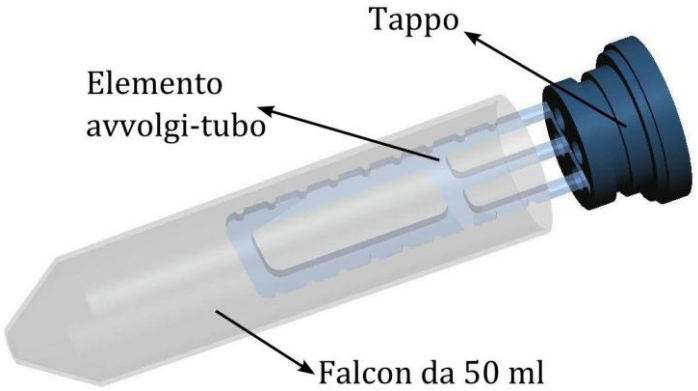


Figura 3.36 *Disegno CAD del deossigenatore parzialmente assemblato. Si distinguono il tappo, la struttura su cui avvolgere il tubo e la falcon utilizzata per contenere il volume di gas.*

Sul tappo (Figura 3.37) sono stati realizzati quattro fori filettati, utilizzati per connettere il deossigenatore al circuito idraulico e alla linea dei gas. Per quanto riguarda la connessione del circuito idraulico (IN medium e OUT medium), sono stati scelti connettori in polipropilene che presentassero un attacco luer-lock di tipo femmina, da interfacciare con i connettori di tipo maschio presenti sul circuito; questa configurazione rende agevole la connessione del deossigenatore al circuito, effettuata sotto cappa. Dal lato gas (IN gas e OUT gas), invece, non è necessario che venga mantenuta la sterilità in quanto i due ambienti non entrano direttamente in contatto; sono stati quindi utilizzati due connettori con profilo portagomma, intercambiabili in base alle dimensioni del tubo utilizzato per l'immissione del gas. Per quanto riguarda il lato medium, invece, sulla superficie interna del tappo sono stati posizionati dei connettori portagomma con diametro interno 1.6 mm (Codice S210-6, Value Plastics), su cui viene calzato il tubo in silicone lungo 40 cm. In corrispondenza del port OUT gas, infine, una valvola unidirezionale consente l'uscita della miscela di gas, evitando l'ingresso nel deossigenatore di aria con pressioni parziali di gas atmosferiche.

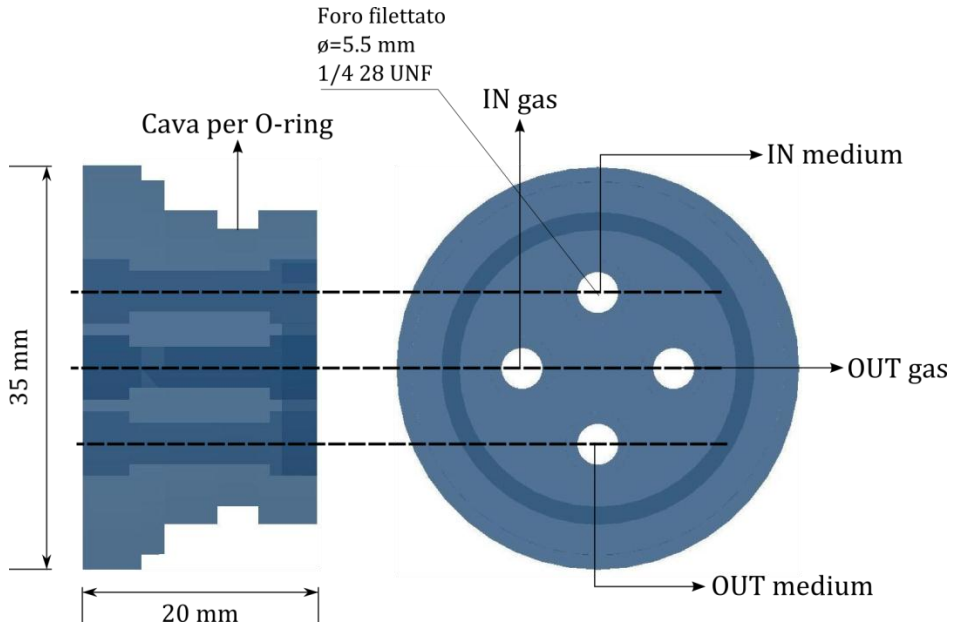


Figura 3.37 *Viste laterale e frontale del tappo del deossigenatore, rappresentazione schematica della disposizione dei fori sulla superficie. IN medium e OUT medium rappresentano l'ingresso e l'uscita dal lato medium; IN gas e OUT gas rappresentano l'ingresso e l'uscita dal lato gas. È evidenziata la cava per l'inserimento dell'O-ring in silicone.*

Sulla superficie interna del tappo è, inoltre, stata realizzata una scanalatura che permette l'inserimento e l'incollaggio dell'elemento avvolgi-tubo. L'accoppiamento con il tubo falcon è, anche in questo caso, realizzato mediante un O-ring, posizionato in una cava realizzata appositamente sulla superficie laterale del tappo.

3.3.2.2.1 Realizzazione

Il tappo è stato realizzato mediante la fresa a controllo numerico Modela MDX-40, partendo da un blocco rettangolare di PMMA; per la realizzazione della cava dell' O-ring si è ricorsi all'impiego del tornio parallelo. L'elemento avvolgi-tubo è stato, invece, realizzato con il laser a CO_2 VersaLaser VLS 2.30, partendo da una lastra in PMMA di spessore pari allo spessore finale desiderato di 2.5 mm.

In Figura 3.38 si può osservare una fotografia del deossigenatore completo del tubo in silicone lungo 40 cm.

Figura 3.38 *Fotografia del deossigenatore; si distingue il tubo in silicone attraverso cui scorre il medium da deossigenare.*

3.4 Visione d'insieme

In Figura 3.39 e in Figura 3.40 sono riportati in dettaglio tutti gli elementi che costituiscono, rispettivamente, la camera di coltura bicompartimentale ed il deossigenatore; per gli elementi progettati è riportato il disegno CAD mentre gli oggetti commercialmente reperibili sono riportati in fotografia.

In Figura 3.41 è riportata una fotografia del sistema assemblato, in cui si distinguono la camera di coltura ed il deossigenatore, posizionati nel supporto, la pompa e il PC del sistema di stimolazione e la pompa appartenente al sistema di deossigenazione.

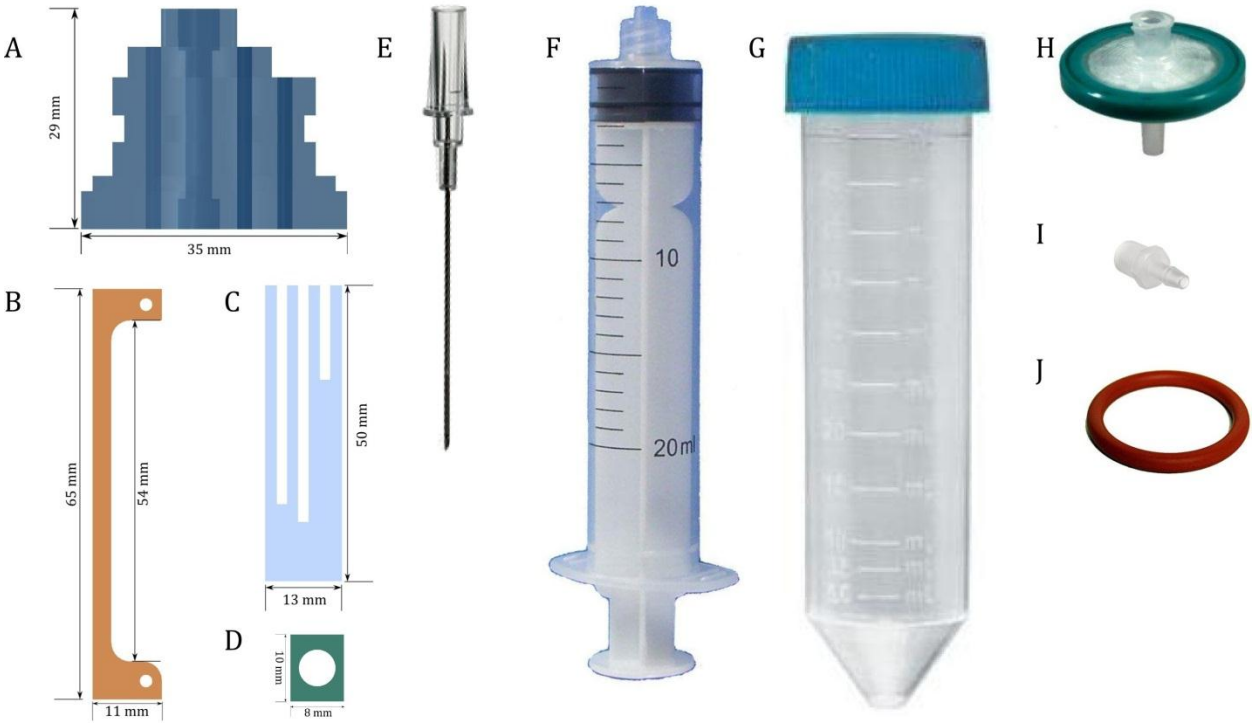


Figura 3.39 *Rappresentazione dei componenti della camera bicompartimentale: tappo (A), sponda laterale del telaio (B), elemento guida per le cannule "a pettine" (C), elemento di giunzione del telaio (D), ago cannula (E), siringa da 20 ml da modificare (F), falcon da 50 ml (G), filtro Hepa (H), connettore commerciale con portagomma (I), O-ring in silicone (J).*

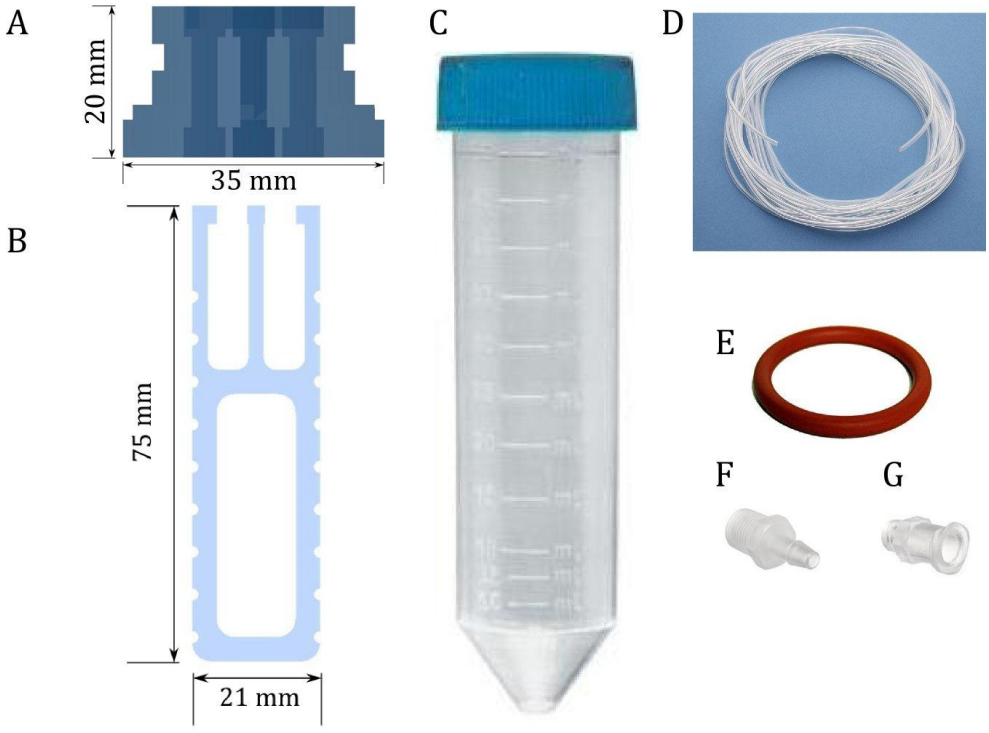


Figura 3.40 *Rappresentazione dei componenti del deossigenatore: tappo (A), avvolgi-tubo B), falcon da 50 ml (C), tubo in silicone con diametro interno e spessore 0.8 mm (D), O-ring in silicone (E), connettore commerciale con portagomma (F), connettore commerciale con attacco luer-lock femmina (G).*

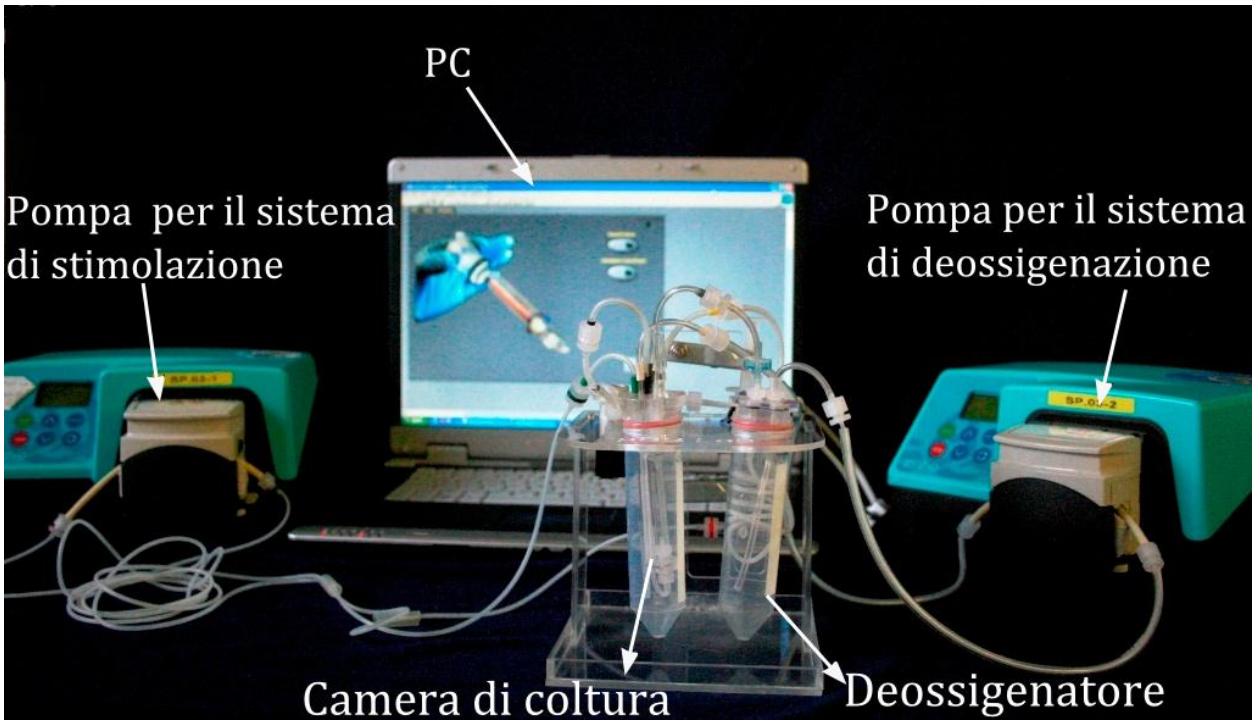


Figura 3.41 *Fotografia del setup completo; si nota la pompa appartenente al sistema di stimolazione (a sinistra), il PC e la strutturata di supporto in cui sono collocati la camera di coltura ed il deossigenatore (al centro) e la pompa appartenente al sistema di deossigenazione (a destra).*

4. Collaudi e campagna sperimentale: metodologie

In questo capitolo saranno inizialmente descritte le metodologie utilizzate per effettuare gli esperimenti di collaudo del sistema bicompartimentale e del circuito di deossigenazione descritti nel dettaglio nel capitolo precedente. Nello specifico verranno riportate le prove condotte presso il µBSLab, volte a valutare la compatibilità della camera di coltura bicompartimentale con il sistema di stimolazione e alla verifica sperimentale dell'efficacia del modulo deossigenante.

Successivamente saranno descritti gli esperimenti preliminari condotti presso il Centro Cardiologico Monzino utilizzando segmenti di vena safena umana.

Infine, sarà presentata la campagna sperimentale estensiva su segmenti di vena safena umana, condotta impiegando la camera di coltura monocompartimentale descritta nei paragrafi iniziali del capitolo precedente.

4.1 Collaudo del sistema bicompartimentale e del circuito deossigenante

Tutte le prove descritte in questo paragrafo sono state condotte presso il µBSLab, in ambiente non sterile, utilizzando al posto del campione di vena safena un sostituto artificiale in silicone, di dimensioni paragonabili a quelle del vaso (diametro interno 1.6 mm, spessore 0.8 mm, lunghezza 5 cm), e acqua demineralizzata al posto del medium di coltura.

4.1.1 Protocollo di verifica della tenuta idraulica

La prima fase del collaudo del sistema è stata dedicata all'accertamento della tenuta idraulica della camera, fondamentale per il mantenimento della sterilità in coltura. L'attenzione è stata focalizzata sui punti critici, rappresentati dall'interfaccia tra il tappo e la camera esterna e dagli accessi presenti sul tappo, a livello dei quali potrebbero essere presenti micro-fessure che consentirebbero l'infiltrazione di microrganismi potenzialmente dannosi per il campioni biologico; verificando l'assenza di trafilamenti di fluido si esclude la presenza di tali fessure. Il sistema è stato assemblato, secondo le modalità che saranno descritte in dettaglio nel paragrafo 4.2.2, e riempito con acqua demineralizzata, attraverso gli accessi luer presenti sul tappo. Gli accessi luer sono quindi stati serrati medianti appositi tappi e la camera è stata capovolta e mantenuta in questa configurazione per 12 ore. L'eventuale presenza di trafilamenti è stata valutata visivamente monitorando ai livelli del liquido all'interno della camera. In Figura 4.1 è mostrata una foto della configurazione mediante la quale è stata verificata la tenuta idraulica della camera.

Figura 4.1 *Configurazione della camera di coltura per la valutazione del mantenimento della tenuta idraulica.*

I risultati di questo test non hanno evidenziato la presenza di trafilamenti di liquido né dagli accessi presenti sul tappo né dall'accoppiamento realizzato tramite O-ring.

4.1.2 Protocollo di verifica della compatibilità con il sistema di stimolazione

È stata, quindi, esaminata la compatibilità del sistema di stimolazione con la camera di coltura bicompartimentale e con il sistema di deossigenazione. La camera è stata connessa al circuito di stimolazione e al circuito di deossigenazione, mediante i rispettivi accessi dedicati presenti sul tappo, ed entrambi i sistemi sono stati posti in esercizio per un tempo pari a 48 ore. Sebbene questo intervallo di tempo sia inferiore ai 7 giorni di esercizio del sistema negli esperimenti condotti con campioni biologici, è stato ritenuto sufficiente al fine di valutare la compatibilità tra gli elementi e la funzionalità dell'intero sistema in esercizio. Per quanto riguarda il sistema di deossigenazione, è stata imposta una portata di ricircolo del fluido, costituito da acqua demineralizzata, pari a 5 ml/min e non è stato immesso gas all'interno del modulo deossigenante, in quanto, questa prova era finalizzata ad una caratterizzazione dal punto di vista idraulico del sistema. La stimolazione è stata effettuata utilizzando un sostituto artificiale del vaso (tubo in silicone) a cui è stato applicato un pattern pressorio pulsatile nel range 80-120 mmHg con frequenza 0.5 Hz.

Una seconda serie di prove la stimolazione è stata effettuata applicando diversi pattern pressori al fine di esplorare in modo completo il comportamento del sistema, valutando la risposta all'aumento della frequenza della pulsazione e alla variazione del range pressorio. Sono state quindi condotte due serie di prove: inizialmente mantenendo il range pressorio a 80-120 mmHg la frequenza di pulsazione è stata aumentata a 0.75 e 1 Hz, quindi, mantenendo la frequenza a 0.5 Hz, il range pressorio è stato traslato a 60-90 mmHg e 100-140 mmHg.

4.1.3 Collaudo del sistema di deossigenazione

Per validare il modello matematico di dimensionamento e l'efficacia del sistema deossigenazione, è stata condotta una serie di esperimenti, con l'obiettivo di verificare la correttezza delle scelte progettuali effettuate. Sono state, quindi, allestite due tipologie di esperimenti, i primi volti a verificare il comportamento del deossigenatore in assenza di ricircolo per validarne il dimensionamento, i secondi volti a valutare il comportamento nel transitorio, fino al raggiungimento del valore di regime, replicando le condizioni reali di esercizio del deossigenatore, caratterizzate dal continuo ricircolo del medium contenuto nella camera interna del bioreattore. A tal fine si è ricorsi all'impiego di un sensore di Clark

(DO-166FTL-AC, Lazar Research Laboratories Inc., Los Angeles, USA), un dispositivo elettrochimico che permette di misurare per via amperometrica la concentrazioni di ossigeno disciolto in un liquido. Per una descrizione più accurata del principio di funzionamento del sensore di Clark si rimanda all'APPENDICE B.

Il sensore (Figura 4.2 b) è stato connesso, mediante un connettore BNC, ad una centralina (Figura 4.2 c), fornita dalla casa produttrice del sensore, che, oltre ad amplificare il segnale, lo converte da segnale in corrente a segnale in tensione. Infine, sempre mediante una connessione realizzata con cavo BNC-BNC, il segnale è inviato ad un lettore (Figura 4.2 a) che consente sia la visualizzazione real time della concentrazione di O_2 letta, sia la registrazione del segnale mediante software, in seguito alla connessione, mediante cavo seriale, del lettore ad un PC.

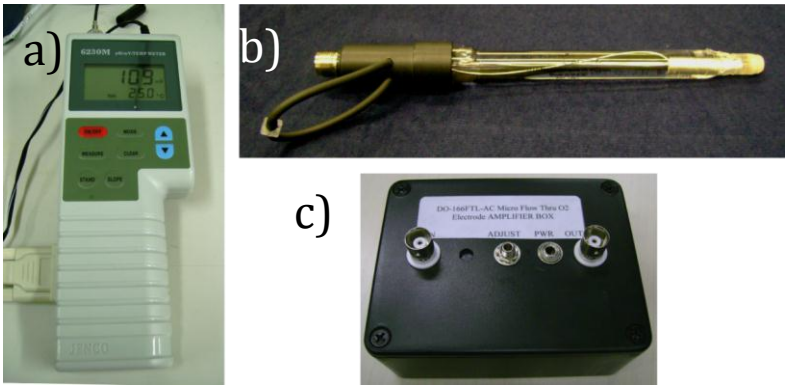


Figura 4.2 *Lettore per la visualizzazione del segnale (a), elettrodo di Clark (b) e centralina (c).*

Prima di ogni utilizzo del sensore, come indicato nel manuale di istruzioni, è richiesta una procedura di calibrazione. Questa procedura richiede, come primo step, la connessione del sensore alla centralina, la connessione di questa al lettore ed in ultimo la connessione della scatola di controllo all'alimentazione. A questo punto è possibile rimuovere il cappuccio protettivo che ricopre la punta dell'elettrodo e sospendere quest'ultimo in aria, con la punta rivolta verso il basso, per alcuni minuti, fino al raggiungimento di un valore di equilibrio. Infine, agendo sul potenziometro presente nella centralina (ADJUST in Figura 4.2) è possibile impostare il valore di tensione desiderato. Tenendo in considerazione che i valori letti vanno interpretati secondo la conversione *0.1X mV = X% Ossigeno* i produttori consigliano di effettuare la calibrazione in modo che, in atmosfera, il valore misurato sia di 210 mV, che corrispondono al 21% di O_2, ovvero una pressione parziale di circa 160 mmHg in condizioni standard.

4.1.3.1 Prove in assenza di ricircolo del mezzo

Inizialmente è stata condotta una seria di test in condizioni caratterizzate dall'assenza di ricircolo del fluido di lavoro. Questa tipologia di esperimento è finalizzata alla caratterizzazione del modulo deossigenante in condizioni semplificate rispetto a quelle reali di esercizio. In particolare, l'obiettivo è determinare l'efficacia della deossigenazione in un singolo passaggio del fluido di lavoro all'interno del modulo deossigenante. La configurazione realizzata per le prove è mostrata in versione schematica in Figura 4.3.

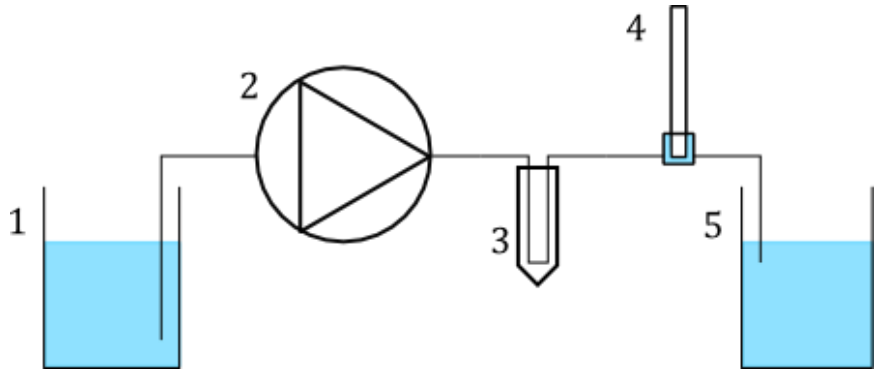


Figura 4.3 *Schema del setup allestito per le prove senza ricircolo; si distinguono il reservoir da cui viene attinto il fluido di lavoro (1), la pompa peristaltica (2), il deossigenatore (3), il sensore di misura della pO_2 (4) e il secondo reservoir in cui viene convogliato il fluido (5).*

Attraverso una pompa peristaltica, il fluido di lavoro, consistente in acqua demineralizzata, lasciato precedentemente ad equilibrarsi in atmosfera viene prelevato da un reservoir. Esso scorre all'interno del deossigenatore, in cui il lato gas è alimentato da un flusso di azoto puro, di portata pari a 0.3 l/min, e in seguito in una flow cell realizzata appositamente (descritta in APPENDICE B) calzata sulla punta del sensore per la misura della pO_2. Dopo il passaggio nella flow cell il fluido viene convogliato all'interno di un secondo reservoir. In fase di progettazione è stata fissata a 40 cm la lunghezza del tubo all'interno del deossigenatore per cui, mantenendo invariato questo parametro, sono stati esplorati gli effetti della variazione della portata sul valore di pO_2 in uscita dal deossigenatore.

Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato, applicando i seguenti valori di portata 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 8 ml/min; questi valori sono stati scelti sulla base del modello della deossigenazione impiegato per il dimensionamento del circuito, descritto nel paragrafo 3.3.2.1.1. In tutti i casi le prove sono state protratte fino al raggiungimento di un valore di pO_2 stabile, per almeno 10 minuti.

4.1.3.2 Prove con ricircolo del mezzo

Questa serie di prove è stata realizzata con l'obiettivo di riprodurre i fenomeni relativi alla fase di transitorio e al raggiungimento del valore di regime; a tal fine si è cercato di riprodurre nel modo più fedele possibile le condizioni reali di esercizio del sistema, caratterizzate dal continuo ricircolo del mezzo all'interno del modulo deossigenante. Come mostrato in Figura 4.4 il setup allestito consta della camera di coltura da cui il fluido di lavoro viene prelevato per mezzo di una pompa peristaltica, portato alla flow cell in cui è immerso il sensore, quindi al deossigenatore e, infine, reimmesso nella camera. Il lato gas del deossigenatore è stato alimentato con un flusso di azoto puro pari a 0.3 ml/min, regolato tramite un flussimetro. Per replicare le condizioni di coltura all'interno dell'incubatore la camera ed il deossigenatore sono posti all'interno di un bagno termostatato mantenuto a 37 °C (±0.5°C) attraverso una piastra riscaldante, retroazionata mediante una sonda immersa nel bagno.

Sono state eseguite quattro prove, applicando al fluido una portata pari a 5 ml/min che, in base a quanto verificato nel paragrafo 3.7.2.2, risulta essere la portata massima limite, per la lunghezza di tubo scelta, pari a 40 cm; le prove sono state protratte fino al raggiungimento di un valore di pO_2 stabile, per almeno 30 minuti.

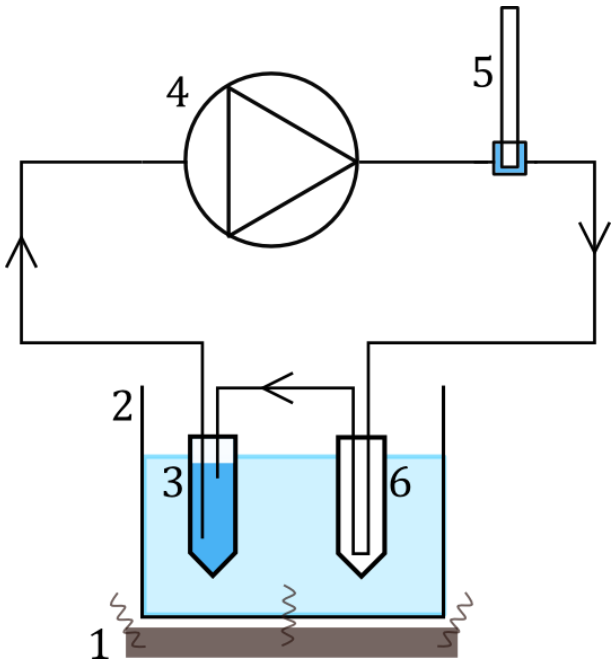


Figura 4.4 *Rappresentazione schematica del setup allestito per le prove con ricircolo; si distinguono la piastra riscaldante (1) per il mantenimento del bagno (2) a 37°C, la camera di coltura (3) da cui viene prelevato il fluido di lavoro per mezzo della pompa (4), il sensore per la pO_2 (5) e il modulo deossigenante (6) in cui il fluido scorre prima di essere reimmessa nella camera.*

4.2 Protocolli di messa in esercizio del sistema bicompartimentale con campioni di vena safena umana

Ultimata la fase di collaudo su banco, il passo successivo è stato la verifica della compatibilità della nuova configurazione bicompartimentale in esperimenti di coltura di segmenti di vena safena umana, con particolare attenzione al mantenimento della sterilità, al fine di accertare l'assenza di microrganismi e agenti contaminanti potenzialmente dannosi per la vitalità del campione biologico. I segmenti di vena safena utilizzati in questi esperimenti preliminari del sistema bicompartimentale e nella campagna sperimentale estensiva, descritta nel paragrafo 4.3, sono destinati alla ricerca in quanto ritenuti di scarto o in esubero rispetto al necessario per essere impiegati come graft in interventi di CABG. I segmenti di vena safena vengono preparati dal chirurgo che si occupa della rimozione del tessuto circostante il vaso e dell'occlusione, mediante sutura o clip metalliche, dei vasi collaterali e consegnati all'interno di un contenitore sigillato riempito con terreno di coltura al personale del LIT. I campioni biologici vengono quindi conservati, immersi in terreno di coltura addizionato con 1% di penicillina-streptomicina, all'interno di un frigorifero a 4°C fino al momento dell'utilizzo, solitamente entro il giorno successivo all'espianto.

4.2.1 Operazioni preliminari

Una delle specifiche fondamentali per i sistemi di coltura che prevedono l'interazione con materiale biologico è il mantenimento della sterilità durante tutta la durata della coltura. La presenza di eventuali microrganismi è infatti potenzialmente dannosa per il campione, in quanto potrebbe alterarne la vitalità e influire sui risultati dell'esperimento.

Prima di ogni esperimento tutti gli elementi che compongono il sistema di coltura sono stati sottoposti ad un protocollo di decontaminazione e sterilizzazione:

- la camera di coltura, comprensiva della camera interna, il deossigenatore e i tubi del circuito idraulico sono stati messi a bagno in una soluzione allo 0.5% di Anyosime DD1 (Laboratoires Anios, Lille-Hellemmes, France) in acqua tiepida. Per la disinfezione accurata dei tubi la soluzione è stata fatta fluire all'interno. Questa procedura consente di diminuire la carica batterica iniziale presente. Dopo alcuni minuti i componenti sono stati risciacquati accuratamente con acqua demineralizzata ed asciugati con aria

filtrata; anche in questa fase è stata prestata particolare attenzione ai tubi, in quanto residui di detergente che possono rimanere al loro interno potrebbero essere nocivi per il campione biologico in fase di coltura.

- la camera di coltura, la camera interna ed il deossigenatore sono stati consegnati al reparto di sterilizzazione del Centro Cardiologico Monzino dove, imbustati separatamente, sono stati sterilizzati con ossido di etilene (EtO). I tubi, invece, sono stati sterilizzati per mezzo di un'autoclave disponibile presso il LIT.

4.2.2 Protocollo di assemblaggio del sistema in ambiente sterile

Prima di essere messo in esercizio il sistema richiede l'assemblaggio, effettuato sotto cappa a flusso laminare in conformità con le norme di buona pratica di laboratorio, al fine di mantenere la sterilità dei componenti. Ad eccezione della camera esterna, monouso e disponibile già sterile presso il laboratorio, gli altri elementi sono sterilizzati previamente in buste sigillate separate, che vengono posizionate sotto cappa e aperte solo al momento dell'utilizzo del loro contenuto. Per una descrizione dettagliata della procedura di montaggio del vaso nella camera di coltura e dell'assemblaggio della camera di coltura, del modulo deossigenante e del circuito idraulico, si rimanda all'APPENDICE C.

In breve, dopo l'individuazione di eventuali valvole a "nido di rondine", la vena viene calzata sui connettori presenti sul telaio portavaso ed ancorata mediante *vessel loop* (Figura 4.5 a e b). Il passo successivo consiste nell'inserimento del telaio portavaso nella camera interna e, quindi, nella riserva, costituita dal tubo falcon da 50 ml (Figura 4.5 c e d). In seguito, si posizionano i filtri HEPA e si procede con la connessione dei tubi del circuito di stimolazione e del circuito di deossigenazione, a cui viene connesso anche il deossigenatore.

Viene effettuato, quindi, il riempimento della camera. Sono stati utilizzati due diversi tipi di medium, di cui uno solo contenente rosso fenolo, al fine di poter monitorare visivamente l'effetto della stimolazione, nell'ottica di avere un sistema bicompartimentale. Nello specifico, la camera interna è stata riempita con RPMI 1640, privo di rosso fenolo, mentre la camera esterna, il cui contenuto andrà a perfondere l'interno del vaso, è stata riempita con 20 ml di DMEM, contenente rosso fenolo (Figura 4.6). Entrambi i medium utilizzati sono stati addizionati con il 20% di FBS, l'1% di penicillina-streptomicina e l'1% di L-glutammina.

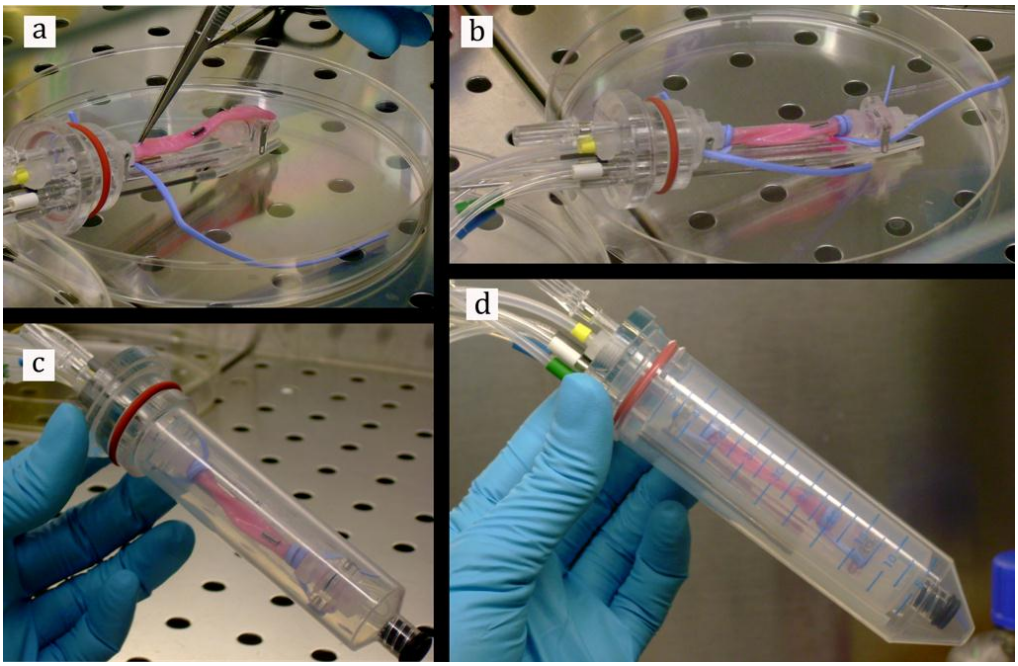


Figura 4.5 *Fasi dell'assemblaggio sotto cappa; si nota come il vaso venga calzato sui connettori (a), l'ancoraggio del vaso mediante vessel loop (b), l'inserimento del telaio nella camera interna (c) e nella camera esterna (falcon da 50 ml) (d).*

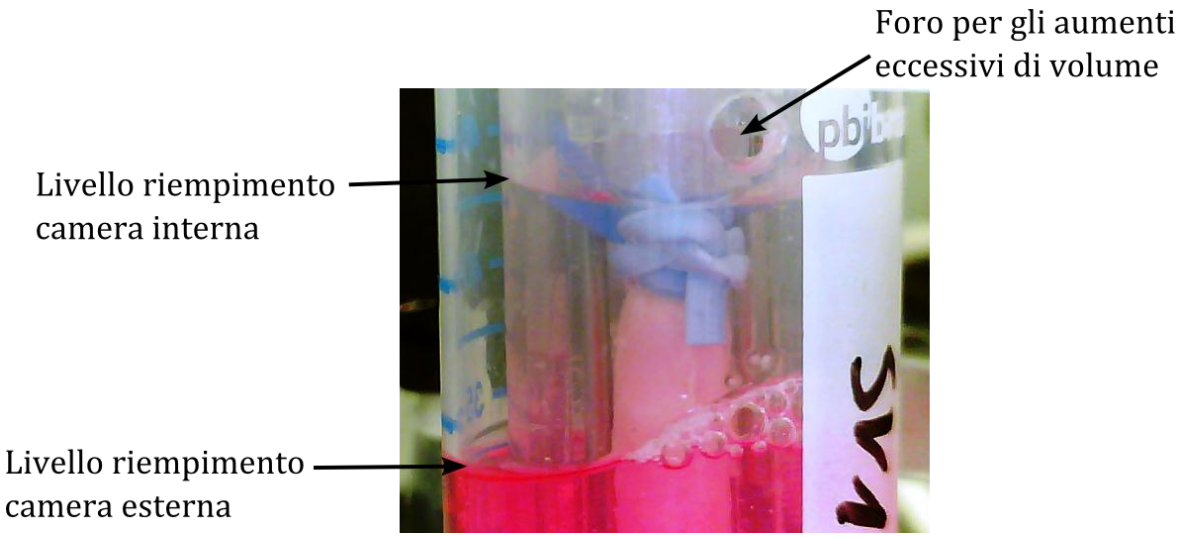


Figura 4.6 *Zoom sui livelli del medium nei due compartimenti della camera di coltura; si distingue il foro realizzato per contrastare gli eccessivi aumenti di volume nella camera interna.*

In Figura 4.7 è mostrata una fotografia del sistema di coltura assemblato sotto cappa a flusso laminare.

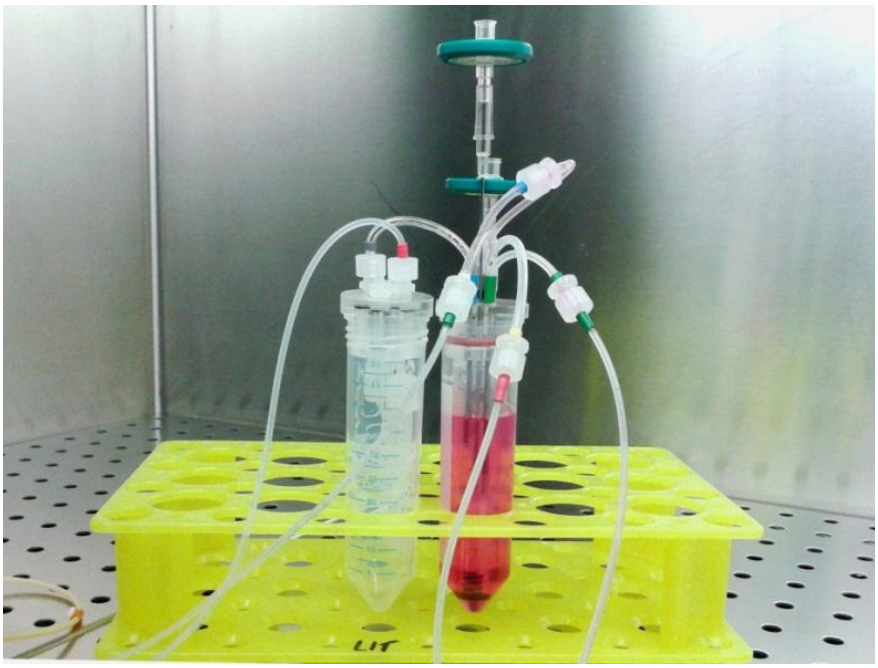


Figura 4.7 *Sistema di coltura assemblato sotto cappa; a sinistra si distingue il deossigenatore connesso con la camera di coltura, a destra.*

4.2.3 Prove di verifica della funzionalità del sistema con vena safena umana

Una volta assemblato il sistema sotto cappa a flusso laminare si è proceduto con la verifica del comportamento del sistema di coltura in esercizio con segmenti di vena safena umana e, allo stesso tempo, è stato verificato il mantenimento della sterilità fino a 7 giorni. Non sono state effettuate prove di mantenimento della sterilità senza campione biologico in quanto, rispetto al sistema monocompartimentale, su cui queste prove erano già state effettuate con esito positivo, il sistema bicompartimentale non presenta differenze estremamente significative.

Le prove sono state condotte seguendo i protocolli di sterilizzazione e assemblaggio in ambiente sterile, descritti rispettivamente nei paragrafi 4.2.1 e 4.2.2. Sono stati condotti due esperimenti; in un primo caso la vena è stata perfusa in condizioni venose, nel secondo caso, invece, è stata applicata una stimolazione di tipo arterioso. In entrambe le prove condotte il sistema di deossigenazione è stato connesso e posto in esercizio. Tuttavia allo stato attuale dei lavori non è stato possibile utilizzare l'azoto, necessario per la deossigenazione, all'interno del laboratorio del LIT, per disposizioni inerenti alla sicurezza sul luogo di lavoro. La presenza del sistema di deossigenazione è stata quindi esaminata

solamente dal punto di vista idraulico e non è stato possibile verificarne l'efficacia in condizioni di esercizio.

Per verificare l'assenza di contaminazione sono state condotte analisi microbiologiche su aliquote di medium (V=2ml), prelevate dalle bottiglie contenenti i terreni di coltura, a tempo 0, e dai due compartimenti della camera di coltura a tempo 0, dopo 3.5 giorni e al termine della coltura, e mantenute in tioglicolato fluido BBL[12] (BD. Becton, Dickinson and Company, Maryland, USA).

Campione	Prova	Condizioni di Prova	
		Intraluminali	Extra-avventiziali
SV 106	Perfusione	Q = 3 ml/min P = 7 mmHg Durata 7 giorni	Q = 5 ml/min Durata 7 giorni
SV 111	Stimolazione	P = 80-120 pulsatile f = 0.5 Hz N° cicli = 300 $t_{stimolazione}$ = 10 min $Q_{ricircolo}$ = 1 ml/min $T_{ricircolo}$ = 2 min Durata 7 giorni	Q = 5 ml/min Durata 7 giorni

Tabella 4.1 Schema riassuntivo delle due prove condotte utilizzando il sistema bicompartimentale.

4.3 Campagna sperimentale con campioni di vena safena umana

In questo paragrafo sarà trattata la campagna sperimentale, condotta parallelamente alle attività di sviluppo del sistema di coltura bicompartimentale, su campioni di vena safena umana, utilizzando la camera di coltura monocompartimentale ottimizzata descritta nel paragrafo 3.3. Tutte le prove sono state condotte presso il Centro Cardiologico Monzino; i campioni impiegati sono stati destinati alla ricerca in quanto non utilizzabili come bypass aorto-coronarici. Le vene utilizzate sono state ottenute da pazienti, prevalentemente di sesso maschile, di età media pari a 66 anni (±7.3 anni), i cui quadri clinici mostravano la presenza di ipertensione arteriosa (IA), dislipidemia (DIS), diabete mellito (DM), ipercolesterolemia (IC), obesità, tabagismo, familiarità per CAD e altre patologie (Figura 4.8).

[12] Il tioglicolato fluido BBL è un terreno universale per la coltivazione di anaerobi, microaerofili e aerobi, ed è raccomandato come terreno per i test di sterilità per i campioni biologici.

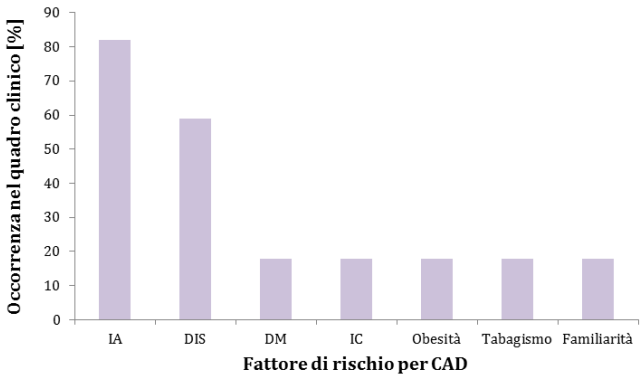


Figura 4.8 *Percentuale di occorrenza dei fattori di rischio per CAD nel quadro clinico dei pazienti da cui sono stati ottenuti i campioni venosi.*

4.3.1 Definizione dei gruppi sperimentali

La campagna sperimentale è stata condotta su n=12 segmenti di vena safena, divisi in due gruppi sperimentali:

- Segmenti perfusi (6 campioni): le vene assegnate a questo gruppo sono state sottoposte a condizioni venose, riprodotte in termini di flusso stazionario con portata pari a 3 ml/min;
- Segmenti stimolati in regime pressorio arterioso CABG-like (6 campioni): le vene assegnate a questo gruppo sono state sottoposte a condizioni arteriose, riprodotte in termini di pressione pulsatile nel range 80-120 mmHg.

In Tabella 4.2 è riportato uno schema della suddivisione dei gruppi sperimentali e delle condizioni di prova.

Gruppo sperimentale	Campioni	Condizioni di prova
Perfusione venosa VP	SV 82 SV 83 SV 84 SV 85 SV 91 SV 92	Q = 3 ml/min P = 5 mmHg Durata 7 giorni
Stimolazione CABG-like	SV 69 SV 73 SV 79 SV 88 SV 92 SV 94	P = 80-120 pulsatile f = 0.5 Hz N° cicli = 300 $t_{stimolazione}$ = 10 min $Q_{ricircolo}$ = 1 ml/min $T_{ricircolo}$ = 2 min Durata 7 giorni

Tabella 4.2 Schema riassuntivo della suddivisione dei campioni nei gruppi sperimentali.

Da ogni campione di vena safena, prima del montaggio all'interno del sistema di coltura, è stato prelevato un segmento di lunghezza pari a circa 0.5 cm che è stato immediatamente fissato in paraformaldeide al 4% e incluso in paraffina; questo costituisce, per ogni esperimento, il campione di controllo a tempo zero per le analisi istologiche.

L'attribuzione di un campione al rispettivo gruppo sperimentale è stata determinata in base alle dimensioni del vaso. In particolare i segmenti di lunghezza minore sono stati attribuiti al gruppo perfuso, in quanto, gli effetti di bordo determinati dalle diverse proprietà meccaniche all'interfaccia tra il tessuto biologico e il connettore su cui è calzato comprometterebbero la corretta stimolazione del vaso. Inoltre, la lunghezza ridotta rende più complessa la procedura di alloggiamento del vaso, con il rischio che si verifichino piccole perdite all'interfaccia con il connettore, condizione in cui la stimolazione in condizioni arteriose non può essere effettuata. Tutte le prove sono state condotte per un periodo pari a 7 giorni.

4.3.2 Protocollo di assemblaggio in ambiente sterile

Il protocollo di assemblaggio rispecchia nella quasi totalità quello già delineato nel paragrafo 4.2.2, con alcune variazioni legate, in questo caso, all'impiego di una camera monocompartimentale. In particolare, non sono richiesti i passaggi riguardanti il posizionamento della camera interna e la connessione del circuito di deossigenazione, inoltre, in questa configurazione il riempimento viene effettuato con 40 ml di solo DMEM. In Figura 4.9 sono riportati alcuni degli step della procedura di montaggio del vaso all'interno della camera.

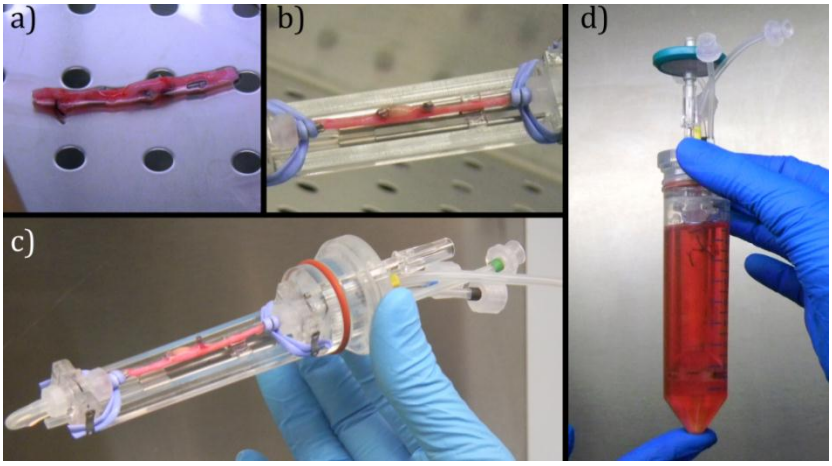


Figura 4.9 Fasi dell'assemblaggio sotto cappa; preparazione del vaso (a), zoom sull'ancoraggio del vaso mediante vessel loop (b), camera di coltura con il vaso alloggiato (c), inserimento della camera nella riserva e riempimento (d).

4.3.3 Procedura di messa in esercizio

A seguito della sterilizzazione dei componenti e del loro assemblaggio in ambiente sterile, la procedura di messa in esercizio del sistema si articola nei seguenti punti:

- Realizzazione delle connessioni tra circuito idraulico e componenti hardware del sistema: il tubo sottopompa viene posto all'interno della testa pompante; le porzioni di circuito interessate vengono inserite negli appositi organi di occlusione dell'elettrovalvola; la pompa, il sensore di pressione e l'elettrovalvola vengono connessi alla centralina di cablaggio, a sua volta interfacciata al PC mediante la scheda di acquisizione A/D DAQCard. Ad eccezione dell'elettrovalvola e del trasduttore di pressione, tutte le componenti hardware vengono posizionate all'esterno dell'incubatore;
- Posizionamento del sistema di coltura all'interno dell'incubatore (T=37°C, CO_2=5%, umidità=95%);
- Avviamento del sistema di stimolazione mediante il software PINE;
- Ricambio del medium: dopo 3 o 4 giorni di coltura vengono prelevati circa 20 ml del terreno e sostituiti con un volume equivalente di terreno fresco;
- Svuotamento e decontaminazione: al termine dei 7 giorni di coltura il sistema viene disassemblato e il campione biologico conservato per le successive analisi; gli elementi entrati in contatto con il campione e con il terreno di coltura vengono decontaminati seguendo la procedura descritta nel paragrafo 4.2.1.

4.3.4 Analisi biologiche

La preparazione del campione biologico per le analisi istologiche prevede che dalla porzione centrale del campione venga prelevato un segmento di lunghezza pari a circa 1 cm, immediatamente fissato in paraformaldeide al 4% ed incluso in paraffina; la restante parte di tessuto, invece, viene divisa in 2 o 3 frammenti, inseriti in criovials e congelati e conservati a -80°C.

Dal segmento incluso in paraffina vengono ottenute con un microtomo (RM 2145 Leica) sezioni di spessore pari a 5 μm, disposte poi su vetrini per microscopia. Queste sezioni sono utilizzate per le successive analisi morfologiche (di immunofluorescenza e istologiche) ed immunoistochimiche.

4.3.4.1 Analisi morfologiche

Per le valutazioni morfologiche i campioni sono stati sottoposti ad analisi di immunofluorescenza e ad analisi istologica. Le immunofluorescenze consentono di osservare qualitativamente gli effetti della coltura sulle componenti del tessuto di interesse, che vengono marcate con anticorpi specifici. Le istologie forniscono immagini dettagliate delle strutture delle parete vascolare e sono state utilizzate per valutazioni morfometriche dello spessore, del perimetro e dell'area dei campioni.

Le analisi di immunofluorescenza sono state svolte dallo staff di biologi su un campione nativo, un campione stimolato in condizioni arteriose CABG-like e un campione perfuso in condizioni venose. I campioni sono stati sottoposti a due tipi di colorazione, in un primo caso è stato utilizzato un anticorpo specifico per marcare l'α-actina delle SMC, nel secondo caso è stato impiegato invece un anticorpo specifico per il fattore di Von Willebrand delle cellule endoteliali. In entrambi i casi per la colorazione dei nuclei delle cellule è stato utilizzato il DAPI, un agente intercalante del DNA. Le sezioni colorate sono state quindi osservate al microscopio confocale.

Per valutare le modificazioni indotte dalle condizioni di coltura sullo spessore e sulla morfologia della parete del vaso tutti i campioni, nativi, stimolati e perfusi, sono stati sottoposti ad analisi istologiche. Le istologie sono state utilizzate per analisi quantitative della morfometria dei vasi sottoposti a coltura in condizioni venose e CABG-like rispetto a quelli di controllo. Le sezioni sono state sottoposte a colorazione H/E e a colorazione tricromica di Masson[13]; entrambi i protocolli prevedono che le sezioni siano sottoposte al trattamento per la rimozione della paraffina, mediante immersioni del campione in soluzioni con scala decrescente di alcoli, ed, infine, disidratate, mediante soluzioni con scala crescente di alcoli e poste in stufa a 37°C per 12 ore. In APPENDICE D sono riportati nel dettaglio i protocolli seguiti. In seguito alla colorazione i preparati istologici sono stati osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) con ingrandimento 2.5X e 10X. Utilizzando il software AxioVision (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA), per ogni sezione colorata con tricromica di Masson, è stata realizzata una ricostruzione a ingrandimento 10X; questo è stato necessario al fine di ottenere un'immagine ad elevata risoluzione in modo da poter individuare correttamente le strutture della parete del vaso da prendere come riferimento per le valutazioni dello

[13] La colorazione tricromica di Masson rappresenta un metodo di elezione per lo staining del tessuto connettivo; permette di visualizzare in nero i nuclei, in rosso le fibre muscolari e in blu il collagene.

spessore. In Figura 4.10 è riportato il pannello dello strumento di ricostruzione immagini del software AxioVision.

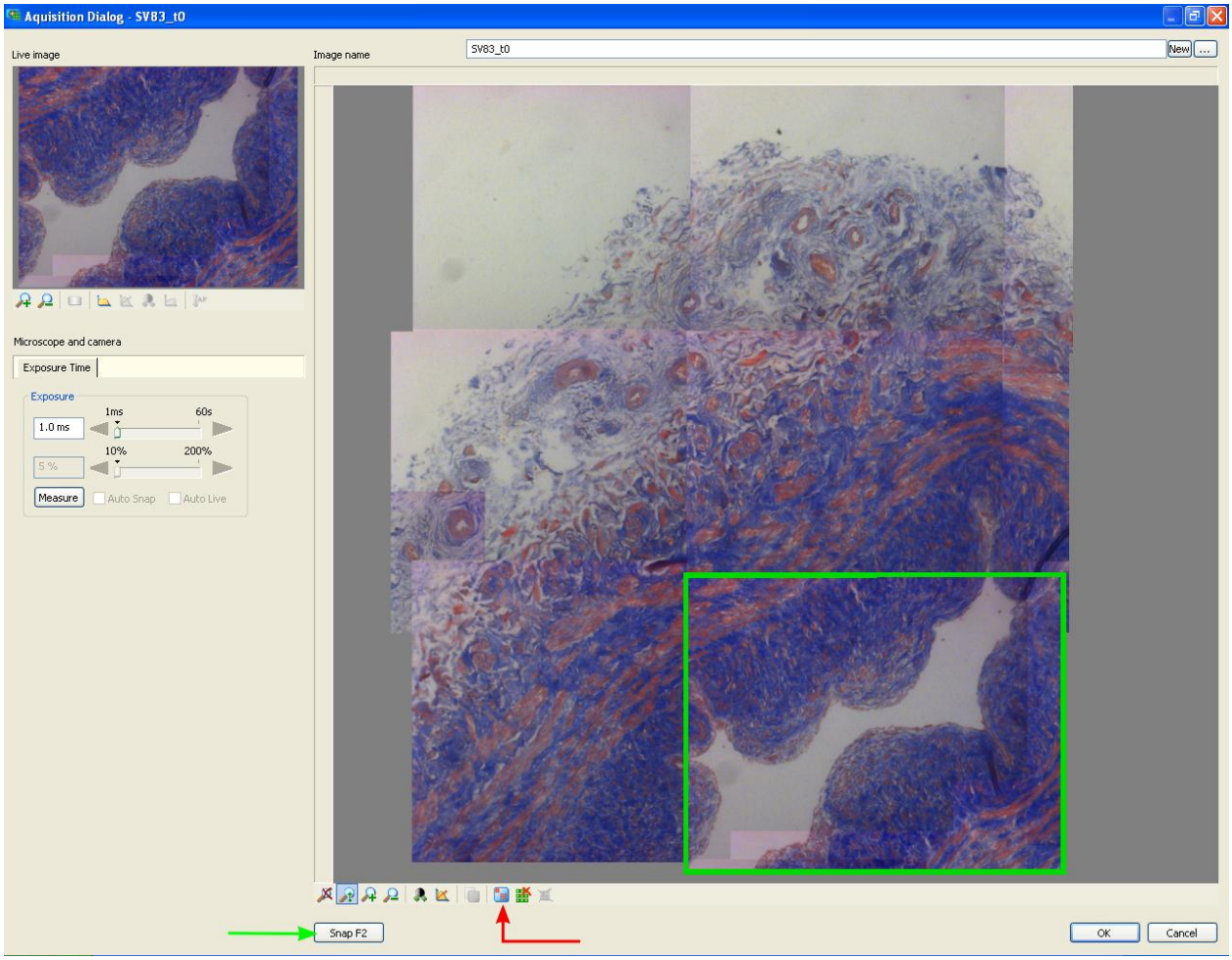


Figura 4.10 *Pannello del software Axiovision per la ricostruzione delle immagini ad ingrandimenti elevati.*

In alto a sinistra nel riquadro "live image" è mostrata l'area di tessuto inquadrata dal microscopio. Mediante il comando "Snap", indicato dalla freccia verde, l'area inquadrata viene acquisita e compare all'interno del pannello principale (immagine con contorno verde). La prima immagine acquisita può essere posizionata in qualsiasi punto dell'area, mentre a partire dalla seconda immagine è richiesto all'operatore di posizionare l'acquisizione circa nel punto corretto. Attraverso il comando "Sticht", indicato dalla freccia rossa, il software colloca la porzione acquisita nel punto esatto dell'immagine completa. Procedendo in questo modo per tutta l'area del campione si ottiene una ricostruzione ad ingrandimento 10X dell'intera sezione.

Le ricostruzioni sono state quindi utilizzate per le analisi morfometriche di misura dello spessore complessivo di tunica media e intima delle sezioni; ogni sezione è stata virtualmente suddivisa in quattro quadranti, in ognuno dei quali sono state effettuate almeno 7-8 misurazioni dello spessore, utilizzando il software AxioVision (Figura 4.11).

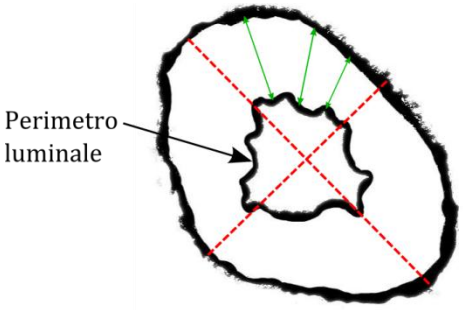


Figura 4.11 *Esempio schematico dell'individuazione dei quadranti (in rosso) e della misura dello spessore complessivo di media e intima (in verde) di una sezione istologica.*

In Figura 4.12-a è riportato un esempio di misura dello spessore della parete di un campione; si nota che per le misure vengono presi come punti di riferimento il lume del vaso e lo strato di fibre muscolari circonferenziali (linea gialla), il software AxioVision fornisce automaticamente la lunghezza del segmento (rettangolo rosso). Sono state escluse dalla misura le aree di tessuto danneggiate dalla procedura di taglio delle sezioni (Figura 4.12-b).

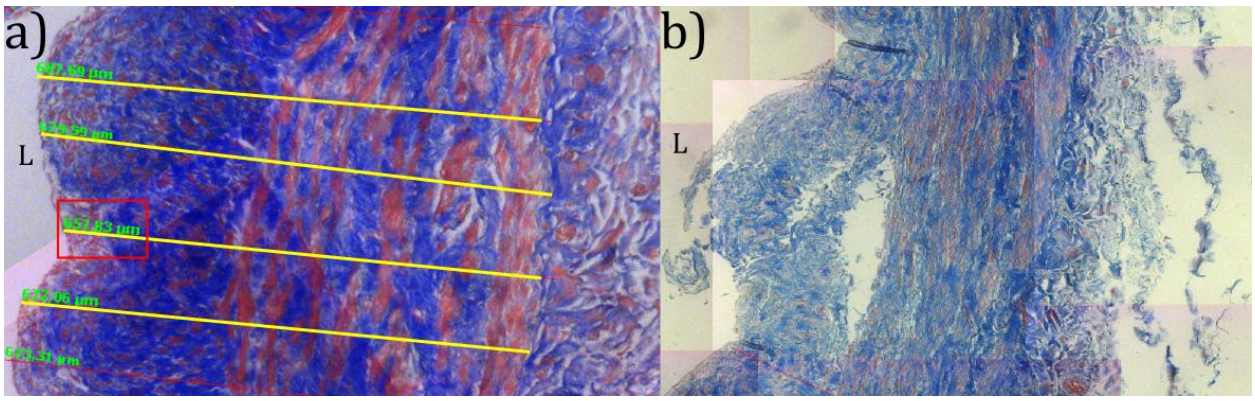


Figura 4.12 *Esempio di misura dello spessore (a) e porzione di tessuto danneggiata, esclusa dalla misura dello spessore (b). L indica il lume del vaso.*

Le ricostruzioni a 10X sono state, inoltre, utilizzate per effettuare misure del perimetro luminale dei campioni, utilizzando il software ImageJ; le immagini sono state convertite da RGB in immagini a 8-bit ed è stata applicata una soglia per rendere l'immagine binaria, il

perimetro è stato, quindi, misurato utilizzando l'apposito tool del software ImageJ. In Figura 4.13 sono riportati nel dettaglio tutti gli step del procedimento appena descritto:

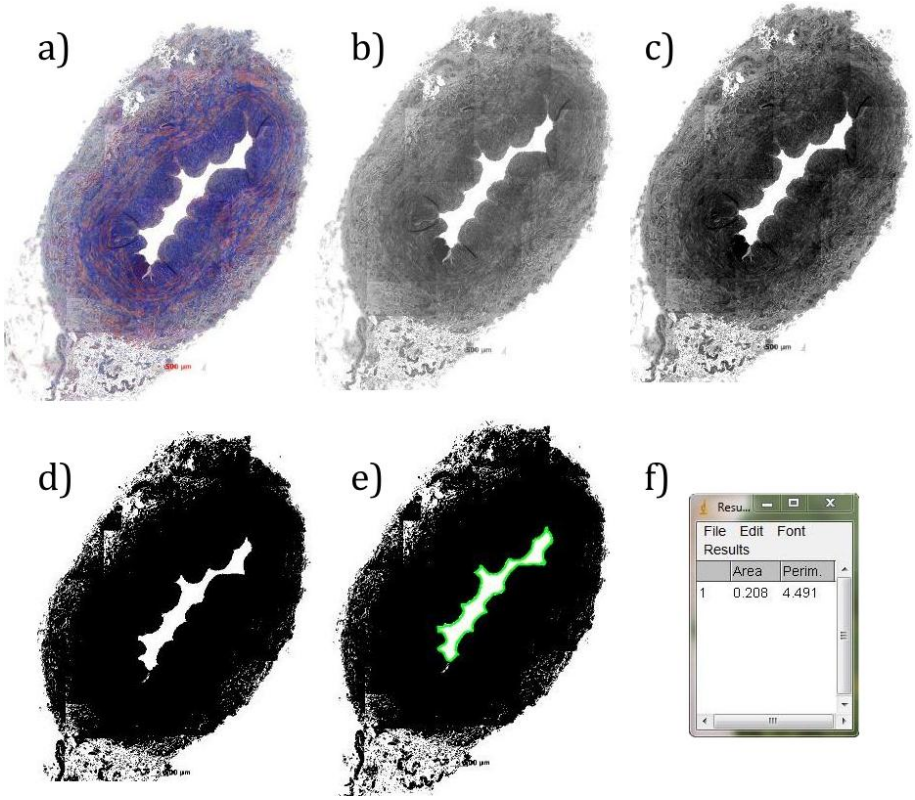


Figura 4.13 *Step del procedimento di elaborazione dell'immagine per la misura di perimetro luminale.*

a) immagine originale;
b) conversione dell'immagine RGB in formato a 8-bit;
c) aumento del contrasto;
d) modifica della soglia per rendere l'immagine binaria;
e) selezione dell'area luminale mediante lo strumento "wand (tracing) tool";
f) misura del perimetro della selezione.

Affinché le misure siano espresse nell'unità di misura desiderata (mm) è necessario impostare la scala, creando una corrispondenza tra numero di pixel sull'immagine e corrispettivo valore nell'unità di misura scelta.

Dalla misura del perimetro, ipotizzando una geometria circolare del lume, è stato ricavato il raggio e calcolata l'area luminale; quest'approssimazione è necessaria in quanto l'area calcolata mediante software risulta fortemente dipendente dal grado di deformazione del campione al momento della sua inclusione in paraffina.

4.3.4.2 Analisi immunoistochimiche

Su 3 campioni del gruppo perfuso e 3 del gruppo stimolato sono state eseguite analisi immunoistochimiche per l'individuazione del marker di proliferazione ki67. Questo test è stato condotto per quantificare la proliferazione cellulare associato alle modificazioni morfologiche della parete del vaso. Il protocollo, che richiede come primo passaggio la rimozione della paraffina dalle sezioni, è riportato in dettaglio in APPENDICE D; in seguito alla colorazione per Ki67 le sezioni sono state disidratate e mantenute in stufa a 37°C overnight. Contestualmente alla colorazione per ki67 le sezioni sono state controcolorate con ematossilina. I preparati sono stati osservati al microscopio ottico Axioskop (Carl Zeiss Microscopy, NY, USA) con ingrandimento 2.5X e 20X. Utilizzando il software AxioVision, per ogni campione sono state acquisite, ad ingrandimento 20X, 5 immagini dell'area periluminale. Alle immagini è stato, quindi, attribuito un codice campione-indipendente e sono state consegnate ad un operatore esperto per la conta del numero totale delle cellule (nuclei marcati con ematossilina e nuclei marcati con ki67) e del numero delle cellule marcate con ki67. Il rapporto tra il numero delle cellule marcate con ki67 e il numero delle cellule totali fornisce indicazioni quantitative sulla proliferazione cellulare.

5. Risultati

In questo capitolo saranno inizialmente descritti e discussi i risultati delle prove di collaudo del sistema bicompartimentale e del circuito di deossigenazione descritti nel capitolo precedente. Verranno riportati i risultati delle prove su banco relative alla verifica della compatibilità del sistema bicompartimentale con il sistema di stimolazione preesistente e gli esiti delle prove di caratterizzazione del comportamento del deossigenatore in presenza e in assenza di ricircolo. Successivamente saranno descritti i risultati delle prove di collaudo della camera bicompartimentale con campioni di vena safena umana, condotte presso il Centro Cardiologico Monzino.

Infine, saranno presentati i risultati della campagna sperimentale estensiva su segmenti di vena safena umana, condotta, presso il Centro Cardiologico Monzino, utilizzando la camera di coltura monocompartimentale descritta nel paragrafo 3.3.

5.1 Risultati delle prove di collaudo del sistema bicompartimentale e del circuito deossigenante

5.1.1 Verifica della compatibilità con il sistema di stimolazione

Dalla prova, condotta utilizzando un sostituto in silicone, è emerso che il sistema di stimolazione è compatibile con la camera di coltura bicompartimentale e con il circuito di deossigenazione; inoltre, poiché la forma d'onda pressoria ottenuta corrisponde a quella desiderata, non è stato necessario ridimensionare la camera di compliance, descritta nel paragrafo 3.1. Questo risultato supporta la scelta fatta di modificare la camera di coltura monocompartimentale e di aggiungere il sistema di deossigenazione all'EVCS preesistente, senza apportare modifiche sostanziali alla sua architettura e al suo funzionamento. A conferma di quanto affermato, in Figura 5.1 sono riportate le registrazioni dei valori pressori durante 30 secondi di stimolazione con il sistema bicompartimentale e con quello

monocompartimentale; si può osservare che anche con il sistema bicompartimentale si può riprodurre la stimolazione desiderata nel range pressorio 80-120 mmHg.

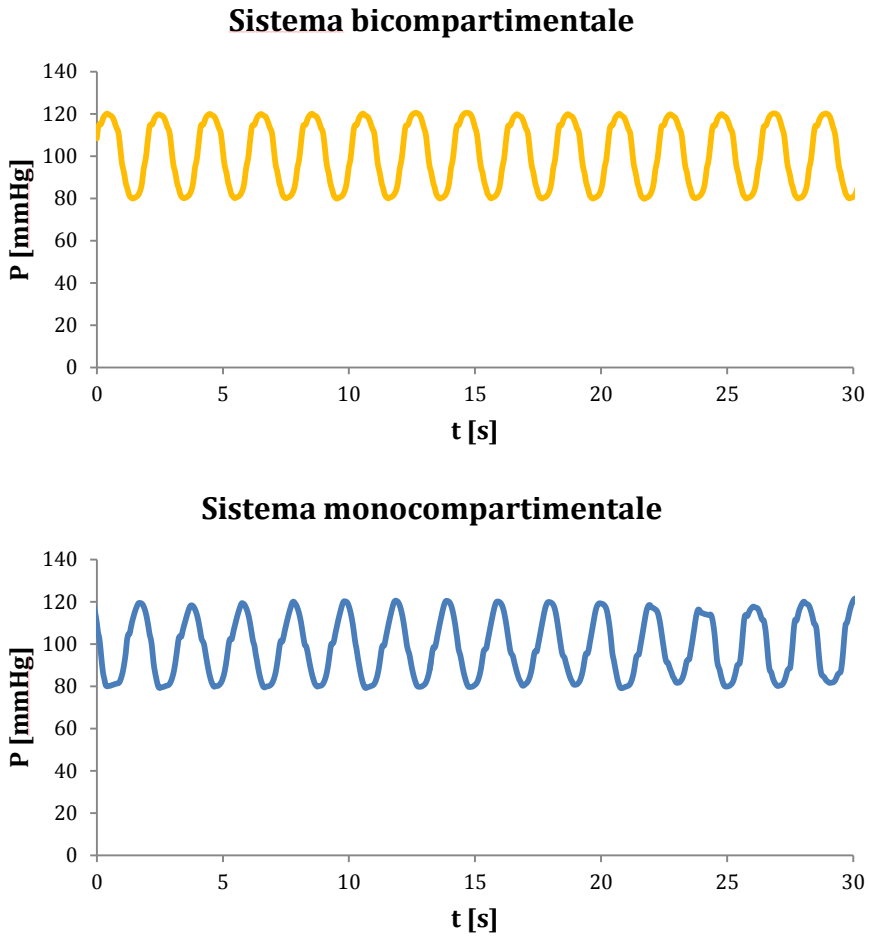


Figura 5.1 *Confronto delle registrazione dei tracciati pressori di stimolazione ottenuti con il sistema bicompartimentale (in alto) e con quello monocompartimentale (in basso).*

Le prove condotte variando i parametri della stimolazione hanno mostrato un buon comportamento del sistema al variare della frequenza e del range pressorio di stimolazione. In Figura 5.2 sono riportati i risultati delle prove; in particolare nei pannelli A B e C si possono osservare i pattern di stimolazione al variare della frequenza di pulsazione imposta, nel pannello D sono invece riportati i pattern di stimolazione al variare del range pressorio. Si può osservare come all'aumento della frequenza di stimolazione imposta il sistema risponda adeguatamente, mantenendo una corretta forma d'onda all'interno del range 80-120 mmHg. Ciò che emerge, inoltre, è la capacità del sistema di generare un pattern pressorio in range differenti da quello fisiologico (80-120 mmHg), al fine di poter ricreare condizioni di ipotensione (60-90 mmHg) e ipertensione (100-140 mmHg).

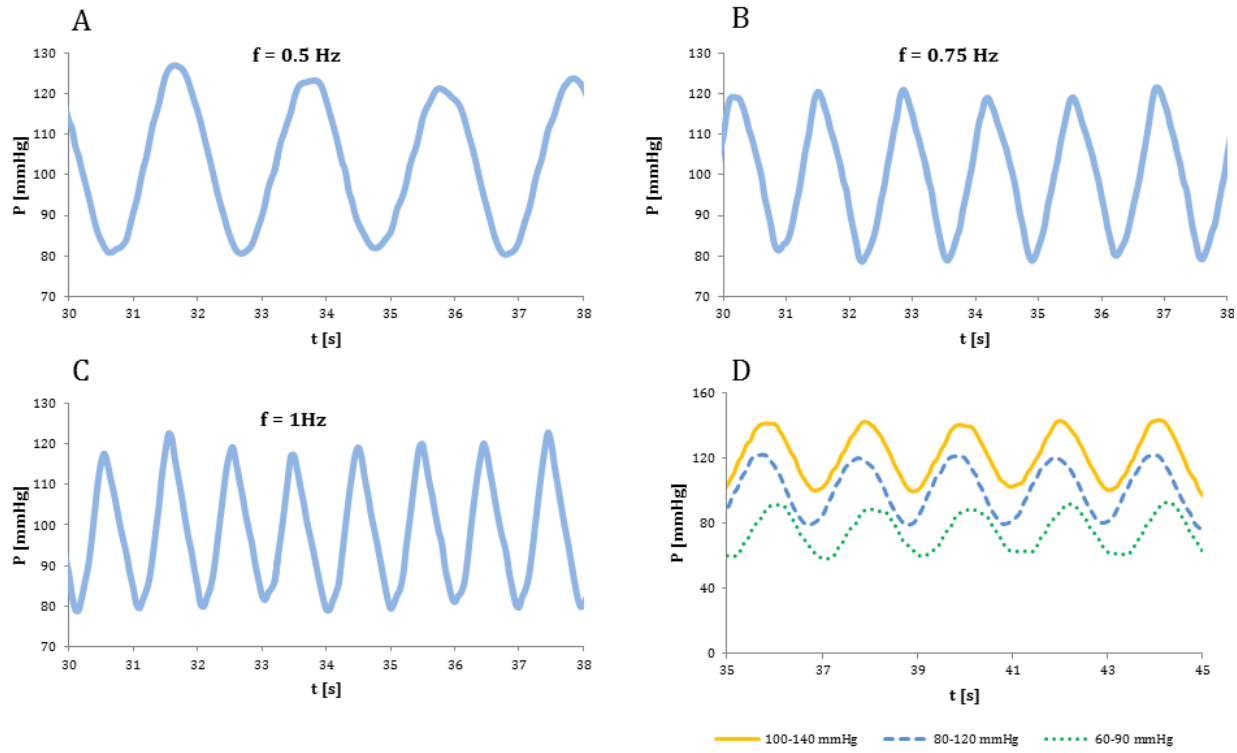


Figura 5.2 *Pattern pressori di stimolazione nel range 80-120 con frequenza di pulsazione pari a 0.5 Hz (A), 0.75 Hz (B) e 1 Hz (C) e pattern di stimolazione con frequenza 0.5 Hz e range pressorio pari a 100-140 mmHg (arancione), 80-120 mmHg (azzurro tratteggiato) e 60-90 mmHg (verde puntinato) (D).*

5.1.2 Risultati del collaudo del sistema di deossigenazione

5.1.2.1 Prove di validazione del dimensionamento del modulo deossigenante

Queste prove sono state condotte per verificare il dimensionamento del modulo deossigenante. Il setup allestito, mostrato in Figura 5.3, è costituito da un circuito aperto in cui il fluido di esercizio viene prelevato da un reservoir mediante una pompa peristaltica e quindi fatto scorrere all'interno del modulo deossigenante, il cui lato gas è alimentato da azoto. Il fluido raggiunge la flow cell in cui è posizionato il sensore per la misura della concentrazione di O_2 disciolto e infine convogliato in un secondo reservoir. Le prove sono state condotte al variare della portata di ricircolo del fluido di esercizio.

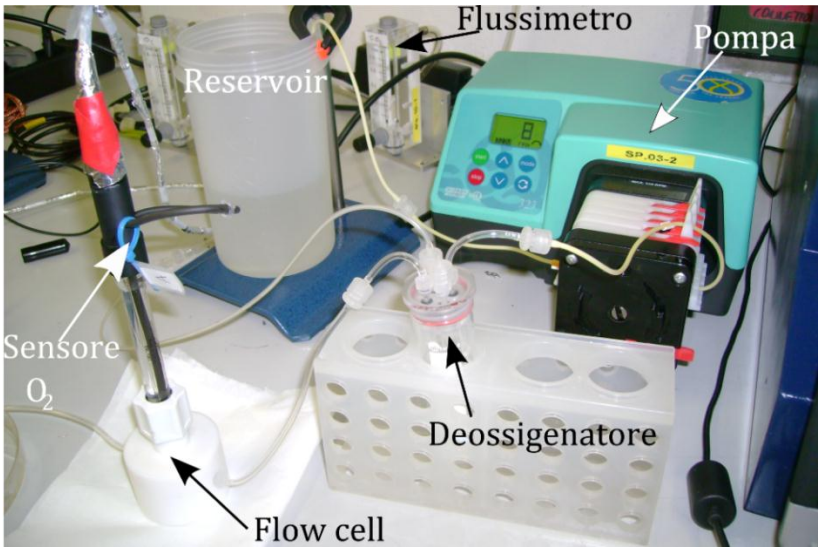


Figura 5.3 *Setup allestito per le prove di validazione del dimensionamento del modulo deossigenante in cui si possono distinguere gli elementi costitutivi del circuito: il reservoir di mandata, la pompa peristaltica, il deossigenatore, alimentato da un flusso di azoto regolato tramite flussimetro, il sensore e la flow cell di misura (l'immagine è stata scattata in una prova preliminare in cui la flow cell non era ancora stata sostituita, vedi APPENDICE B).*

Si è osservato, come previsto, che lo scambio specifico, definito come la differenza di concentrazione di O_2 tra l'ingresso e l'uscita del deossigenatore decresce all'aumentare della portata del fluido da deossigenare, in quanto, per portate crescenti, a parità di lunghezza del tubo lungo cui avviene lo scambio, l'efficienza dello scambio diminuisce (Figura 5.4). Dai dati sperimentali è stata calcolata la media del valore di concentrazione di O_2 all'uscita del deossigenatore raggiunta dopo 5τ nelle tre prove condotte al variare della portata Q. I risultati sperimentali sono stati quindi confrontati con i valori teorici di cO_2 in uscita dal deossigenatore, ricavati dall' equazione (7) del modello trattato nel paragrafo 3.7.2. Il confronto tra il modello teorico e i dati sperimentali è riportato in Figura 5.4. Dal confronto emerge che i dati sperimentali seguono lo stesso andamento del modello, ma che i valori di scambio specifico misurati sperimentalmente sono inferiori rispetto al valore teorico, per ogni valore di portata considerato. La differenza dei valori di scambio specifico è da imputare alla non idealità del sistema e all'impossibilità di ottenere, a valle del deossigenatore, un circuito totalmente impermeabile all'ossigeno, sebbene siano stati impiegati tubi caratterizzati da bassa permeabilità all'O_2. Dalla Figura 5.4 si osserva che la curva sperimentale e la curva teorica mostrano andamenti coerenti al variare della portata imposta, ad indicare che la portata influenza in modo analogo il comportamento sperimentale del deossigenatore e il comportamento teorico ricavato dal modello.

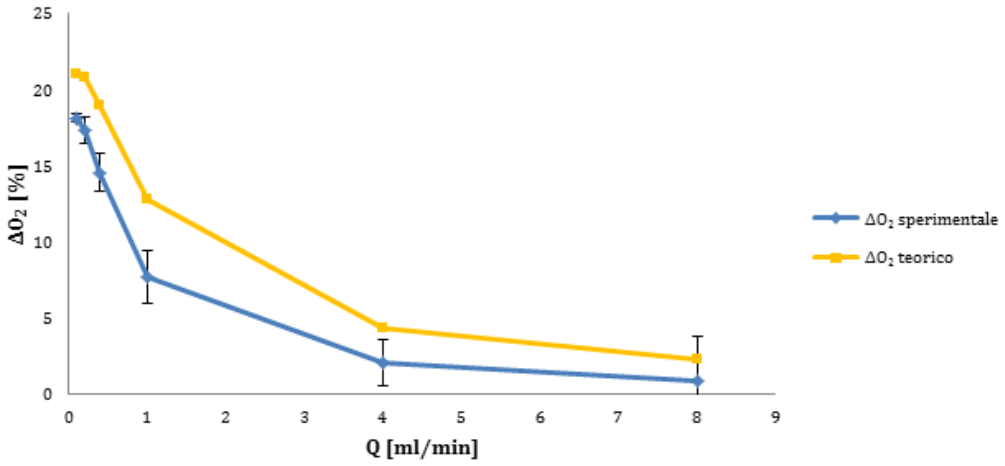


Figura 5.4 *Valori percentuali di ΔpO_2 sperimentali (in azzurro) e teorici (in arancio) per diversi valori di portata.*

I dati sperimentali sono stati confrontati con il modello anche in termini di scambio totale V', calcolato come il prodotto tra il ΔpO_2 e la portata di esercizio (Q). I risultati sono riportati in Figura 5.5, in cui le portate (Q) sono riportate in scala logaritmica.

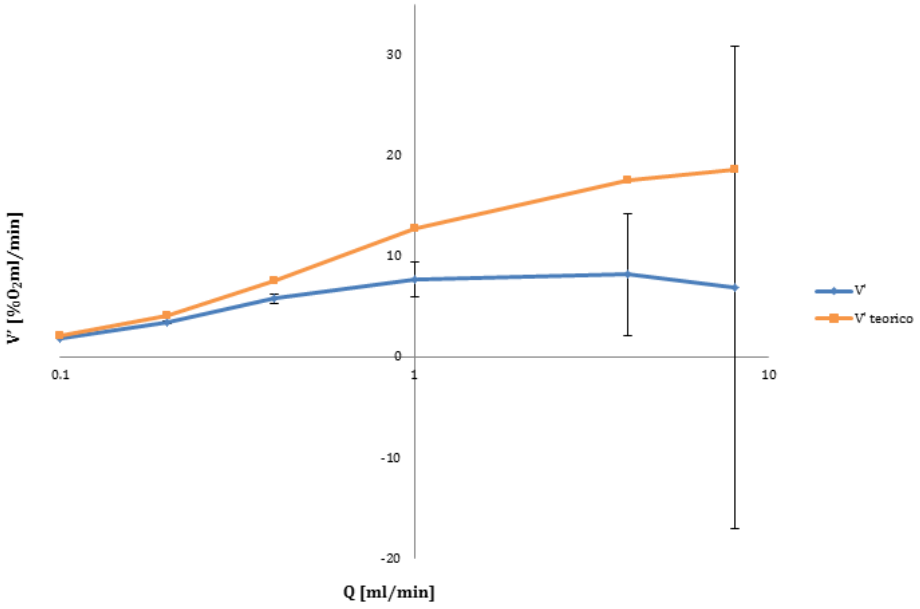


Figura 5.5 *Andamento dello scambio di O_2 ricavato dai dati sperimentali (in azzurro) e dal modello (in arancio) per diversi valori di portata, riportata su scala logaritmica.*

Si può osservare ancora come, all'aumentare della portata, il comportamento sperimentale del sistema si discosti dai valori teorici; ciò che emerge, inoltre, è la tendenza al raggiungimento di un valore asintotico dello scambio, sebbene l'ultimo campione della serie dei dati sperimentali rappresenti un outlier rispetto a questo comportamento. L'andamento asintotico dello scambio di ossigeno indica, come detto anche in fase

progettuale, la presenza di una portata limite oltre la quale un ulteriore aumento non comporta effetti significativi sul comportamento del modulo deossigenante.

In Figura 5.5 per la serie dei valori sperimentali è riportata la deviazione standard (SD), calcolata come il prodotto della SD dello scambio specifico sperimentale (riportato in Figura 5.4) e la portata Q; si osserva come la SD aumenti in modo molto marcato proporzionalmente all'aumento del fattore moltiplicativo Q. La SD molto ampia in corrispondenza dell'ultimo dato sperimentale fornisce una spiegazione all'outlier rispetto alla tendenza al valore asintotico.

5.1.2.2 Prove di validazione del comportamento del sistema di deossigenazione durante il transitorio

Queste prove sono state condotte al fine di validare comportamento del sistema di deossigenazione durante la fase di transitorio; a tal fine il setup allestito, mostrato in Figura 5.6, è costituito da un circuito chiuso in cui il fluido di esercizio viene prelevato mediante una pompa peristaltica dalla camera di coltura e quindi fatto scorrere all'interno del modulo deossigenante, il cui lato gas è alimentato da azoto. Il fluido raggiunge la flow cell in cui è posizionato il sensore per la misura della concentrazione di O_2 disciolto e infine reimmesso nella camera di coltura. La prova è stata ripetuta 4 volte, a parità di condizioni imposte lato gas e di portata di ricircolo della pompa.

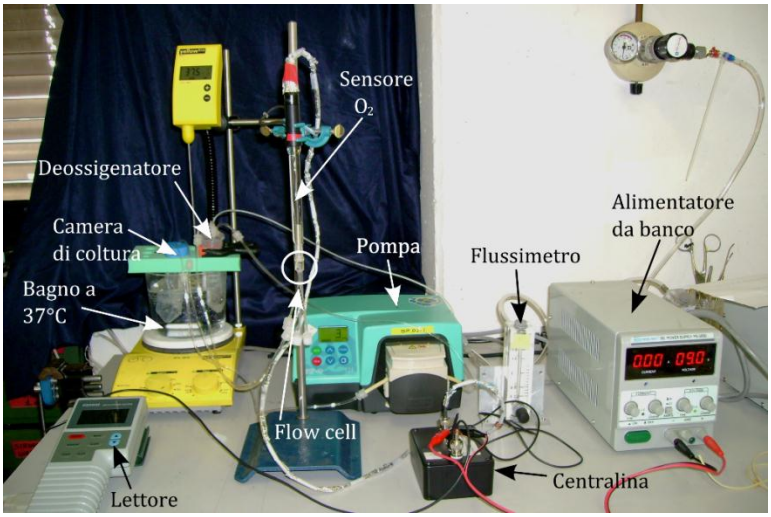


Figura 5.6 *Setup allestito per le prove di validazione in fase di transitorio in cui si possono distinguere gli elementi costitutivi del circuito: la camera di coltura ed il deossigenatore, alimentato lato gas da azoto regolato tramite il flussimetro, mantenuti nel bagno a 37°C, la pompa per la movimentazione del medium e il sensore di O_2 con la relativa flow cell (è mostrata la versione realizzata appositamente, come descritto in APPENDICE B). Sono inoltre mostrati il lettore del sensore e la centralina, alimentata dall'alimentatore da banco.*

In Figura 5.7 sono riportati i valori di pO_2 misurati durante le 4 prove condotte, la media dei valori misurati (in nero) e l'andamento teorico (in arancione), ricavato dal modello.

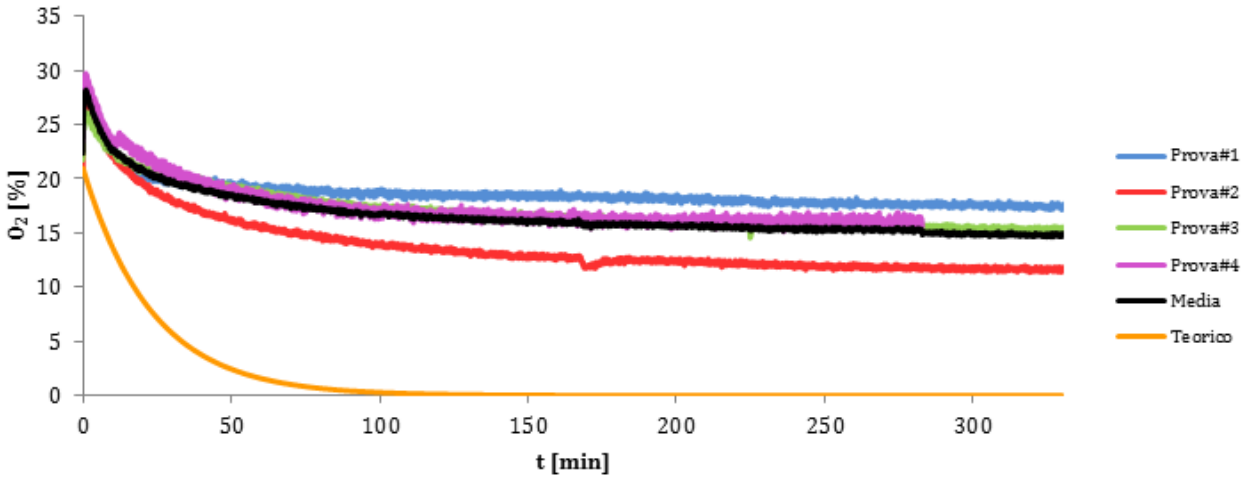


Figura 5.7 *Tracciato della concentrazione di O_2 (O_2%) durante le prove con ricircolo, della durata di almeno 250 minuti (Prova1-4), media dei tracciati sperimentali (Media) e andamento teorico (Teorico).*

Dal grafico in Figura 5.7 si può osservare che i valori sperimentali si discostano dal modello descritto nel paragrafo 3.7.1.2, secondo il quale dopo 5τ (100 minuti per Q pari a 5 ml/min), il sistema dovrebbe raggiungere il valore di regime, caratterizzato da una concentrazione di O_2 equivalente a quella imposta lato gas e pari in questo caso a 0 mmHg. Una prima spiegazione di questo risultato potrebbe essere identificabile nei fenomeni che contrastano il raggiungimento della concentrazione di O_2 desiderata, tra cui la diffusione dal pelo libero e attraverso la parete del sostituto del vaso. Inoltre, sebbene il circuito sia stato realizzato con tubi a bassa permeabilità all'O_2, i materiali impiegati (PVC) non sono totalmente impermeabili alla molecola di O_2; in aggiunta, va sottolineato che anche i connettori presenti sul circuito e la stessa camera esterna sono realizzati con materiali (PP) caratterizzati da una permeabilità non nulla all'O_2, i cui effetti non sono stati però tenuti in considerazione nel modello. Una seconda possibile spiegazione dei risultati ottenuti potrebbe essere legata allo strumento che è stato utilizzato; infatti, come si può notare in Figura 5.8, nei primi minuti dell'esperimento si osserva un picco verso l'alto, rispetto al valore di calibrazione, della pO_2 misurata. Questo fenomeno è stato osservato per tutti i valori di Q applicati al sistema; per questo motivo non sono stati condotti ulteriori esperimenti applicando portate inferiori, a parità delle altre condizioni. Inoltre, l'utilizzo di

portate inferiori aumenterebbe le tempistiche di raggiungimento del valore di pO_2 di regime, rendendole, al limite, paragonabili alla durata del periodo di coltura e quindi inaccettabili.

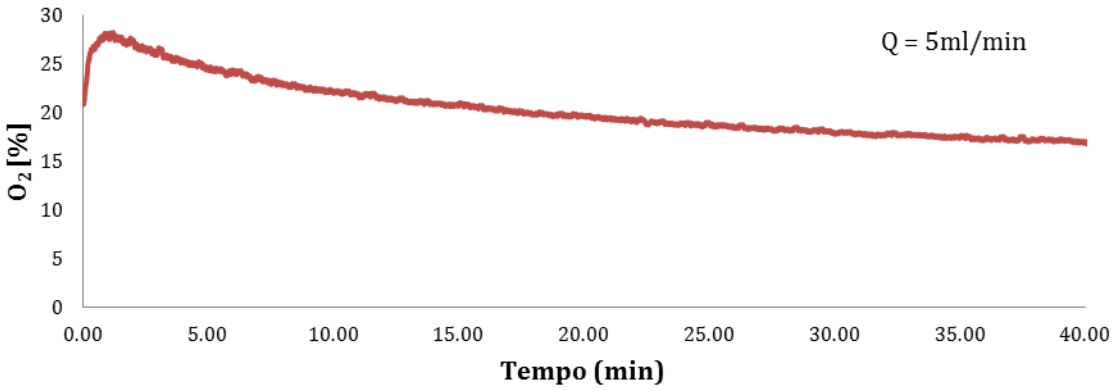


Figura 5.8 *Presunta perdita della calibrazione del sensore all'inizio dell'esperimento.*

La mancata disponibilità di uno strumento di misura alternativo a quello in dotazione non ha reso però possibile verificare quale, tra le ipotesi fatte, sia corretta o abbia l'effetto preponderante. Senza dubbio, le non idealità del sistema influiscono sul valore di pO_2 raggiunto durante il transitorio, tuttavia, le problematiche riscontrate nell'utilizzo del sensore, descritte dettagliatamente in APPENDICE B, ci spingono a tenere in considerazione la possibilità che l'elevata discrepanza tra i dati sperimentali e quelli estratti dal modello teorico sia legata principalmente allo strumento di misura impiegato e non alle assunzioni introdotte nel modello di dimensionamento.

5.2 Verifica funzionale del sistema bicompartimentale in esercizio con campioni di vena safena umana

In seguito al collaudo su banco è stata condotta una verifica funzionale del sistema in esercizio con campioni di vena safena umana; come descritto nel paragrafo 4.2.3, sono state condotte due prove per verificare il comportamento del sistema bicompartimentale in condizioni di perfusione venosa e di stimolazione CABG-like. In entrambe le prove il sistema di deossigenazione è stato posto in esercizio solo per valutarne l'influenza sul sistema dal punto di visto idraulico; non è stato possibile verificare la funzionalità del

sistema di deossigenazione in esercizio per la regolamentazione di sicurezza attualmente in vigore presso il LIT.

In condizioni di perfusione con portata pari a 3 ml/min non sono state osservate variazioni evidenti del livello del medium nei due comparti della camera di coltura, escludendo la quantità di medium evaporata, a causa della temperatura mantenuta a 37°C all'interno dell'incubatore, e ripristinata al momento del cambio mezzo, a 3.5 giorni di coltura. È stato osservato, invece, già dopo il primo giorno di coltura un cambiamento del colore del mezzo RPMI, inizialmente privo di rosso fenolo. In Figura 5.9 si possono osservare il livello e il colore dei medium a tempo 0 e a 3.5 giorni di coltura. Si nota che a 3.5 giorni il livello di riempimento nella camera interna non è aumentato rispetto alle condizioni iniziali, mentre il RPMI appare rosato, rispetto alla trasparenza iniziale.

Considerando che il peso molecolare del rosso fenolo è pari a 354.38 g/mol [43], cioè solo di un ordine di grandezza maggiore rispetto a quello della molecola di O_2, pari a 31.99 g/mol [44], e avendo osservato che i volumi all'interno delle due camere si sono sostanzialmente mantenuti, è probabile che il cambiamento del colore del RPMI sia stato determinato dalla permeazione del rosso fenolo attraverso la parete del vaso. Sebbene questo fenomeno non sia completamente chiarito, ciò che è evidente e di maggiore interesse è l'assenza di variazioni dei volumi di medium che dimostra il mantenimento della compartimentazione fino a 7 giorni di coltura in condizioni di perfusione venosa.

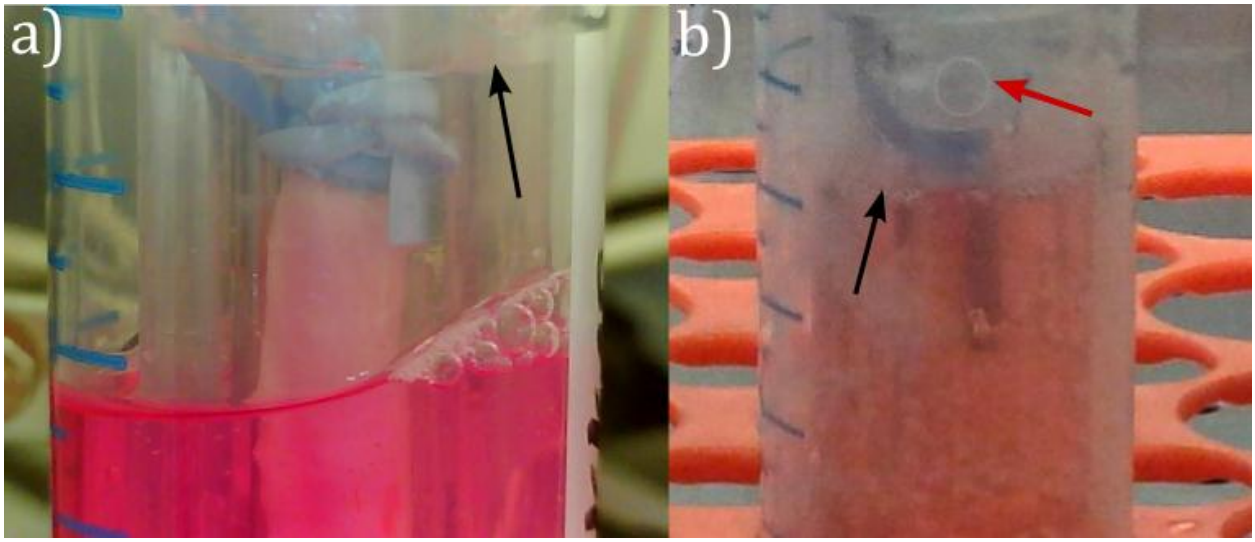


Figura 5.9 *Immagine a tempo 0 (a) e 3.5 giorni di coltura (b) della prova di perfusione con la camera bicompartimentale, si nota che il livello di riempimento della camera interna (frecce nere) non è aumentato a raggiungere il foro troppo pieno (freccia rossa) e che non esiste più una chiara distinzione del colore tra il medium RPMI e DMEM.*

Per quanto riguarda la prova di stimolazione in condizioni CABG-like, anzitutto, è stato nuovamente osservato un cambiamento del colore del medium RPMI inizialmente privo di rosso fenolo, che da trasparente ha acquisito una colorazione rosata. Questo fenomeno è stato osservato già dopo il primo giorno di coltura, probabilmente a causa della permeazione di questa molecola in modalità analoghe a quelle osservate in condizioni di perfusione. Inoltre, a partire dal terzo giorno di prova si osserva l'aumento di volume del medium nella camera interna che grazie alla presenza del foro troppo pieno si è andato a raccogliere nella camera esterna. Escludendo la presenza di perdite a livello dell'interfaccia tra il vaso ed i connettori su cui è fissato, che avrebbero impedito la stimolazione, ed escludendo la presenza di trafilamenti dalla camera interna, di cui è stata verificata su banco la tenuta idraulica, l'aumento di volume potrebbe essere stato determinato dalla permeazione del medium attraverso la parete del vaso. In condizioni di stimolazione, infatti, il tessuto è molto più sollecitato e soggetto a deformazione circonferenziale che in condizioni di perfusione venosa, per cui potrebbero essersi verificati dei fenomeni di rilassamento della parete con conseguente aumento della permeabilità del tessuto e generazione di flussi interstiziali.

Questo fenomeno sembrerebbe inficiare l'efficacia della compartimentazione, tuttavia, per le specifiche finalità di deossigenazione dell'ambiente extra-avventiziale trattate in questo lavoro di tesi, le scelte progettuali dovrebbero garantire il mantenimento della pO_2 obiettivo. Infatti l'aumento di volume nella camera interna, a causa del flusso interstiziale attraverso la vena è stato monitorato e può essere stimato nell'ordine dei 100 µl/min. Avendo imposto una portata di ricircolo del medium contenuto nella camera interna pari a 5 ml/min, costante durante tutto il periodo di coltura, il contributo del flusso interstiziale attraverso la parete del vaso, in termini di pO_2 (pari al 21%), può essere trascurato.

Durante le prove di collaudo funzionale del sistema è stato inoltre verificato il mantenimento della sterilità durante l'intero periodo di coltura (7 giorni) mediante analisi microbiologiche. Le analisi, eseguite sui campioni di medium prelevati dalla camera di coltura durante le due prove, hanno dato esito negativo per la presenza di germi aerobi, anaerobi e miceti; ad indicare il mantenimento della sterilità in entrambe le condizioni sperimentali. In APPENDICE E sono riportati i referti delle analisi microbiologiche svolte.

Dalla verifica funzionale con campioni di vena safena è emerso che, mentre in condizioni di perfusione venosa il sistema mantiene la compartimentazione dell'ambiente intraluminale ed extra-avventiziale fino a 7 giorni, sottoposto a stimolazione pressoria

pulsatile il campione biologico mostra un aumento della permeabilità della parete, con conseguente perdita della compartimentazione. Tuttavia, il significato di questo risultato va interpretato in un'ottica più ampia, tenendo in considerazione che la molecola d'acqua, di cui è composto principalmente il medium di coltura, ha dimensioni dell'ordine dei nm e la sua permeazione attraverso un tessuto biologico è un fenomeno normale. Per le applicazioni di deossigenazione, una stima del fenomeno porta a considerare trascurabile la quantità di O_2 disciolta nel volume di medium, caratterizzato dal 21% di pO_2, che permea dal versante luminale del vaso. La permeazione attraverso la parete del vaso in condizioni di stimolazione potrebbe rappresentare un limite significativo qualora si volesse applicare un diverso condizionamento biochimico all'interno e all'esterno del vaso. L'aggiunta di destrano al medium di coltura, al fine di renderne la viscosità paragonabile a quella del sangue (3 cP), potrebbe rappresentare una soluzione a questo problema. Il sistema bicompartimentale è stato però concepito anche per poter valutare l'effetto di farmaci e studiare l'*homing* cellulare; è in queste applicazioni che il mantenimento della compartimentazione risulta fondamentale. Infatti in queste condizioni sperimentali si vuole valutare l'effetto della somministrazione di molecole farmacologiche o della semina di popolazioni cellulari nel versante intraluminale del vaso sui fenomeni di rimodellamento e sulla distribuzione cellulare all'interno della parete del vaso. Sia le molecole farmacologiche che le cellule hanno dimensioni notevolmente maggiori, almeno di un ordine di grandezza, delle molecole d'acqua, si può ipotizzare, quindi, che in entrambe le condizioni non si assisterebbe ad una permeazione di questi elementi attraverso il tessuto biologico. Tuttavia, ad esempio nelle applicazioni con popolazioni cellulari sarebbe possibile verificare il mantenimento della compartimentazione marcando le cellule seminate nel versante intraluminale e analizzando la loro distribuzione all'interno del tessuto, ed eventualmente in dispersione nei medium di coltura, al termine dell'esperimento. L'assenza di cellule sul versante extra-avventiziale del vaso e in dispersione nel medium della camera interna fornirebbe un'evidenza sperimentale definitiva dell'efficacia del sistema bicompartimentale.

5.3 Risultati della campagna sperimentale estensiva con campioni di vena safena umana

In questo paragrafo verranno riportati i risultati biologici della campagna sperimentale estensiva volta alla caratterizzazione degli effetti della stimolazione arteriosa su segmenti di vena safena umana. Le prove sono state condotte utilizzando la camera di coltura monocompartimentale ottimizzata, descritta nel paragrafo 3.2, e il sistema di stimolazione preesistente. I campioni sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali: n=6 campioni sono stati sottoposti a condizioni di perfusione venosa e n=6 campioni a condizioni di stimolazione arteriosa CABG-like. Al termine della coltura, tutti i campioni sono stati colorati con H/E e tricromica di Masson per le analisi morfometriche e 3 campioni per ogni gruppo sperimentale sono stati sottoposti ad analisi immunoistochimiche (IHC) per l'individuazione del marcatore di proliferazione Ki67. Inoltre, 1 campioni del gruppo stimolato e 1 del gruppo perfuso sono stati sottoposti ad immunofluorescenza (IF). La sintesi delle analisi svolte è riportata in Tabella 5.1.

Gruppo sperimentale	Campioni	Masson	H/E	IHC	IF
Perfusione venosa VP	SV 82	X	X		
	SV 83	X	X	X	
	SV 84	X	X	X	
	SV 85	X	X		
	SV 91	X	X		
	SV 92	X	X	X	X
Stimolazione CABG-like	SV 69	X	X		
	SV 73	X	X		
	SV 79	X	X		
	SV 88	X	X	X	
	SV 92	X	X	X	X
	SV 94	X	X	X	

Tabella 5.1 *Tabella riassuntiva delle analisi svolte sui campioni in seguito al periodo di coltura.*

5.3.1 Mantenimento dell'integrità e delle strutture caratteristiche del campione

Le colorazioni con H/E hanno mostrato, anzitutto, che in condizioni sia di perfusione venosa che di stimolazione CABG-like i segmenti venosi mantenuti all'interno dell'EVCS per 7 giorni mantengono le strutture caratteristiche tipiche della parete del vaso. In Figura 5.10 sono raffigurate 3 istologie ritenute rappresentative del comportamento osservato. Le immagini riportate sono ottenute da sezioni di un campione nativo (Figura 5.10-A), di un campione sottoposto a stimolazione arteriosa CABG-like (Figura 5.10-B) e di un campione sottoposto a perfusione venosa (VP) (Figura 5.10-C), sottoposte a colorazione H/E e acquisite al microscopio ottico ad ingrandimento 2.5 X. In tutte le immagini si può notare che la parete vascolare si presenta integra, che le SMC mostrano un allineamento circonferenziale (indicato dalle frecce nere), che l'ECM non presenta anormalità o crescita abnorme e che, nel complesso, la struttura caratteristica della parete vascolare si è mantenuta in entrambe le condizioni sperimentali.

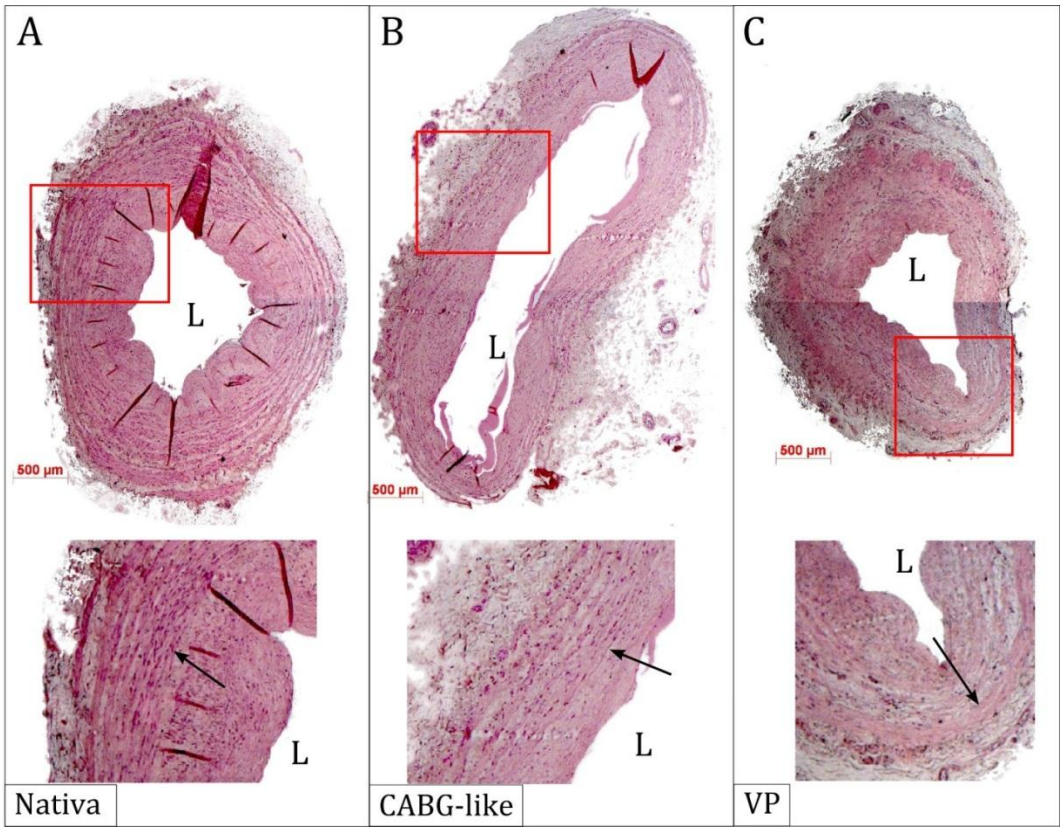


Figura 5.10 *Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 2.5X di sezioni di segmenti di vena safena umana nativa (A), stimolata CABG-like (B) e perfusa VP (C), sottoposte a colorazione H/E; nella parte inferiore dell'immagine sono riportati alcuni ingrandimenti della parete nelle tre condizioni, indicate da frecce nere si possono notare le fibra muscolari disposte circonferenzialmente. L indica il lume del vaso.*

Ciò che si osserva è inoltre la presenza di un rimodellamento morfologico marcato della parete del vaso in seguito a stimolazione CABG-like; lo spessore della parete appare diminuito e si osserva un aumento dell'area luminale. Al contrario, le vene sottoposte a perfusione si mostrano morfologicamente simili rispetto ai vasi nativi; non si osservano evidenti variazioni di spessore e area luminale del campione e l'organizzazione strutturale della parete appare conservata e simile al controllo nativo.

Anche le analisi in immunofluorescenza confermano il mantenimento della struttura della parete vascolare dei campioni durante la coltura in entrambe le condizioni sperimentali. In Figura 5.11 si possono osservare le immagini delle immunofluorescenze relative a un campione nativo (Figura 5.11 A e D), un campione sottoposto a stimolazione arteriosa (Figura 5.11 B e E) e un campione sottoposto a perfusione venosa (Figura 5.11 C e F), acquisite al microscopio confocale. Le immagini A, B e C rappresentano la colorazione per l'α-SMA delle SMC (in verde) e il DAPI per i nuclei cellulari (in blu); le immagini D, E e F rappresentano la colorazione per il fattore di Von Willebrand delle cellule endoteliali (in bianco) e il DAPI per i nuclei cellulari (in blu). In Figura 5.11-A e -C, relative ai campioni statico e perfuso, si osserva la presenza di una struttura organizzata delle SMC (freccia bianca), allineate in direzione circonferenziale rispetto al lume (L). Per quanto riguarda il campione CABG-like (Figura 5.11-B) si può osservare invece una riorganizzazione delle SMC (freccia rossa); queste appaiono concentrate in fasci disposti longitudinalmente nella zona subluminale mentre quelle disposte circonferenzialmente risultano diminuite. Ciò che si può osservare, inoltre, è la presenza di un numero significativo di nuclei cellulari (colorati in blu), nel campione nativo e in entrambi i campioni posti in coltura, ad indicare un'elevata cellularità all'interno dei campioni. Nel pannello inferiore della Figura 5.11 si può osservare nuovamente la distribuzione dei nuclei cellulari (in blu) in tutta la sezione; inoltre la colorazione per il vWF evidenzia la presenza di uno strato endoteliale integro lungo tutto il lume del vaso sia nel campione nativo che nei campioni sottoposti a stimolazione CABG-like e a perfusione venosa (doppia freccia bianca).

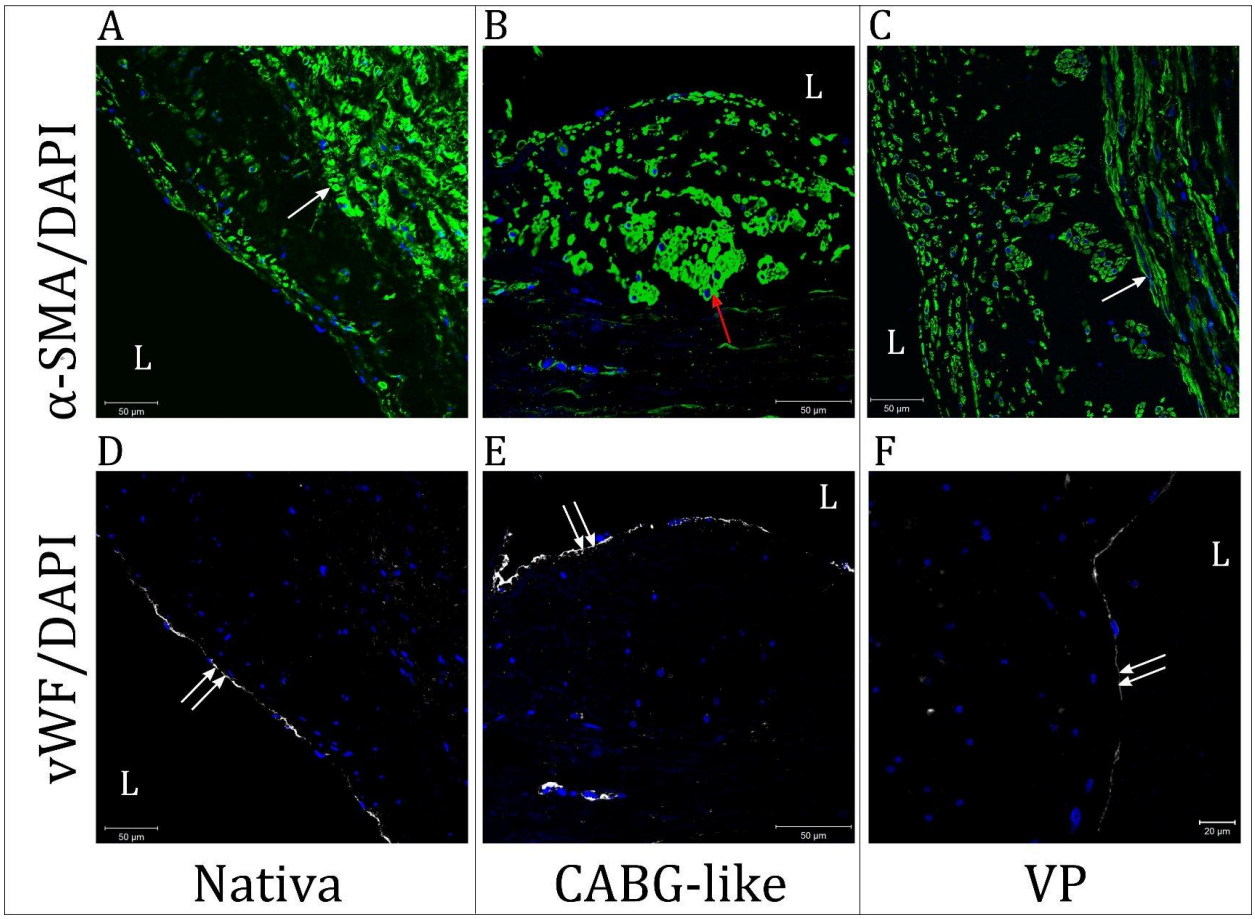


Figura 5.11 *Risultati delle immunofluorescenze con α-SMA (in verde)/DAPI (in blu), nel pannello superiore, e vWF (in bianco)/DAPI (in blu), nel pannello inferiore, su sezioni da campioni nativi, stimolati in condizioni CABG-like e perfusi in condizioni venose (VP). L indica il lume del vaso, la freccia bianca singola indica la disposizione circonferenziale delle fibre muscolari nel campione nativo e nel campione perfuso in condizioni venose, la freccia rossa indica la disposizione in direzione longitudinale delle fibre muscolari nel campione stimolato, la doppia freccia bianca indica lo strato endoteliale, integro nei tre campioni.*

5.3.2 Analisi morfometriche

Dopo aver osservato la presenza di modificazioni morfologiche della parete del vaso dai preparati istologici colorati con H/E, è stata condotta un'analisi quantitativa di questo fenomeno. Per la quantificazione morfometrica sono state utilizzate le sezioni colorate con tricromica di Masson; nei campioni sottoposti a questo tipo di colorazione infatti sono ben evidenti in rosso le fibre muscolari, in blu il collagene e in nero i nuclei cellulari (Figura 5.12).

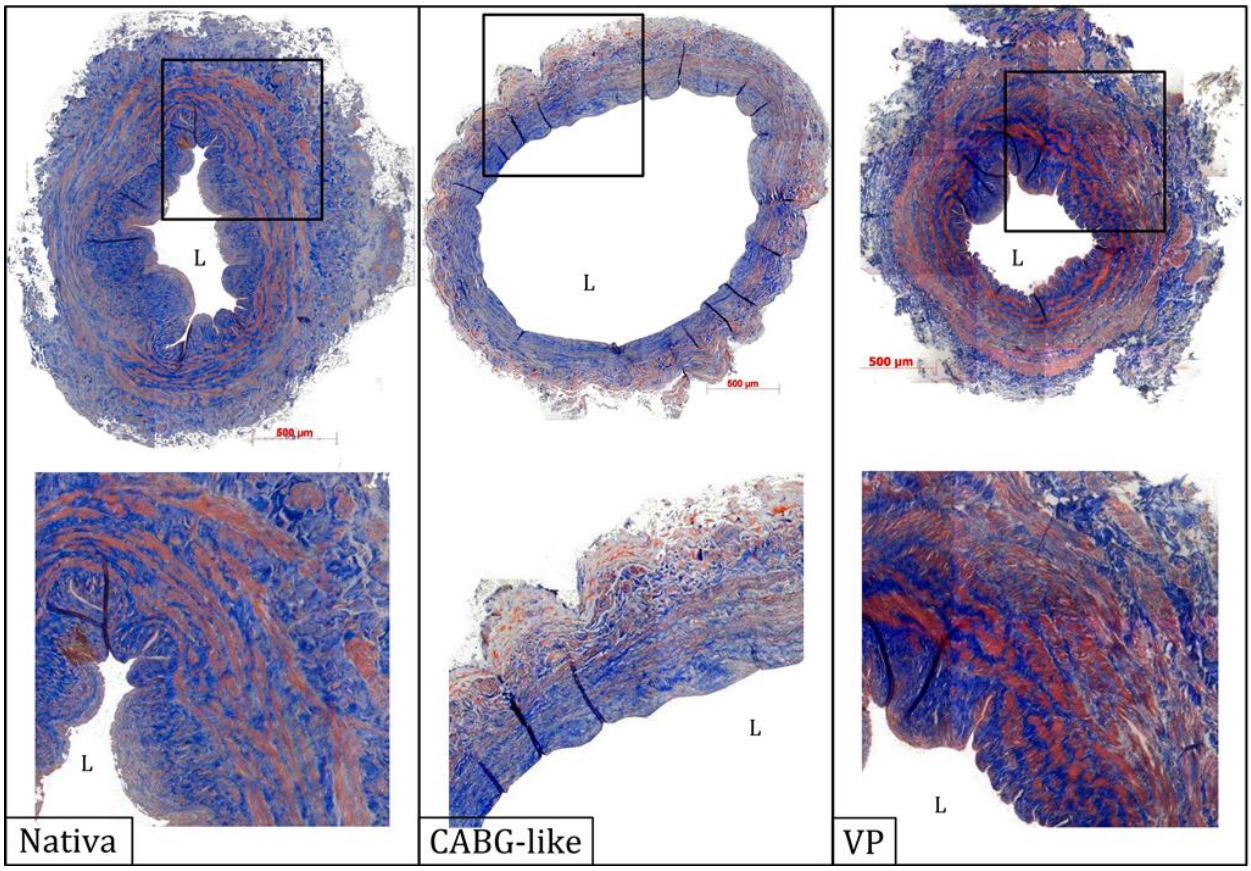


Figura 5.12 *Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 10X di sezioni di segmenti di vena safena umana nativa, stimolata (CABG-like) e perfusa (VP), sottoposte a colorazione tricromica di Masson.*

Come si può osservare in Figura 5.12, questa colorazione evidenzia in modo molto più marcato, rispetto alla colorazione H/E, le fibre muscolari, tipiche della tunica media, consentendo un'identificazione accurata della stratificazione della parete del vaso, fondamentale per la misura dello spessore. Dai preparati istologici riportati in Figura 5.12, esemplificativi dei campioni nativi e dei campioni posti in coltura in perfusione (VP) e in condizioni arteriose (CABG-like), si può osservare l'integrità del tessuto e la presenza di un'organizzazione strutturale delle SMC, che mostrano un allineamento in direzione circonferenziale. Inoltre, anche in questo caso, appare evidente la presenza di un rimodellamento morfologico a carico del campione sottoposto a stimolazione arteriosa CABG-like.

La misurazione dello spessore della parete è stata effettuata sulle sezioni colorate con tricromica di Masson dei campioni perfusi, stimolati e dei rispettivi campioni nativi. In Figura 5.13 è mostrata, a titolo esemplificativo, una porzione del pannello di misura del software AxioVision durante la misura dello spessore della parete di un vaso nativo (SV 83), i valori numerici sono ripetuti nella tabella a fianco.

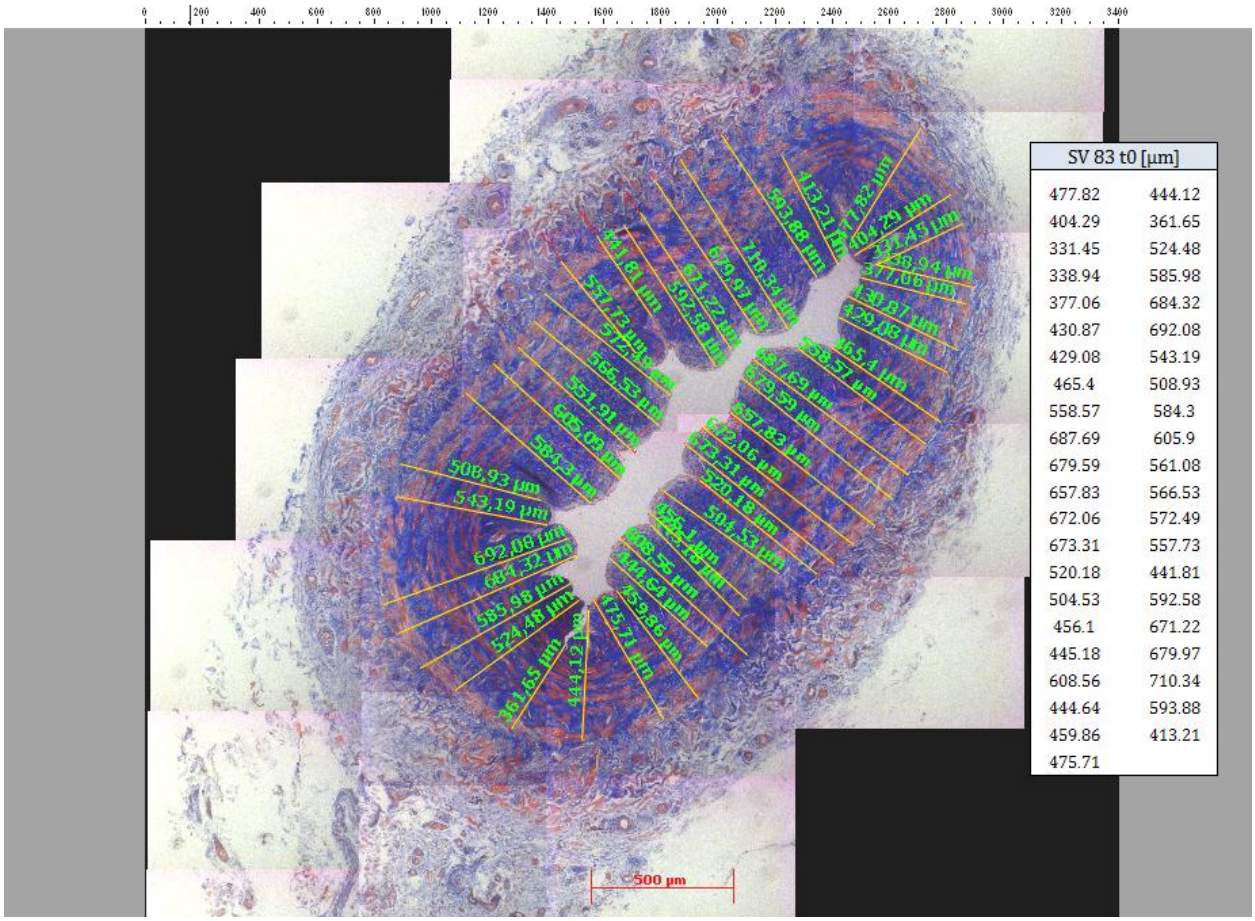


Figura 5.13 *Esempio del procedimento di misura dello spessore della parete di un campione nativo di vena safena.*

Per ogni campione, dalla serie delle misurazioni, almeno 30 per ogni campione, eseguite è stato calcolato il valore della mediana (distribuzione non normale dei dati); su questi valori è stata quindi svolta l'analisi statistica per il confronto tra i campioni perfusi, stimolati e i rispettivi campioni nativi. In Tabella 5.2 sono riportati i valori della mediana dello spessore della parete, calcolati per ogni campione.

CABG-like [µm]		VP [µm]	
t0	t7	t0	t7
841.81	446.875	470.33	404.47
544.35	349.565	543.19	835.78
625.725	404.25	530.9	443.16
456.5	211.465	544.27	370.245
556.81	345.325	277.375	205.42
427.79	206.29	556.81	483.59

Tabella 5.2 *Tabella riassuntiva dei valori mediani dello spessore dei campioni stimolati e perfusi, confrontati con i rispettivi campioni nativi.*

Per i dati completi si rimanda all'APPENDICE F.

I campioni stimolati e perfusi sono stati confrontati con i rispettivi campioni nativi usando il test non parametrico appaiato di Wilcoxon. Il risultato del test statistico, riportato in Figura 5.14, ha mostrato la presenza di una diminuzione statisticamente significativa ($P < 0.05$), pari circa al 43%, dello spessore del campione dopo 7 giorni di stimolazione in condizioni CABG-like, rispetto al vaso nativo. Per quanto riguarda i campioni perfusi in condizioni venose, invece, si osserva una diminuzione statisticamente non significativa ($P = 0.4375$) dello spessore del vaso rispetto al controllo, pari circa al 6%, molto inferiore rispetto a quanto osservato nei campioni stimolati.

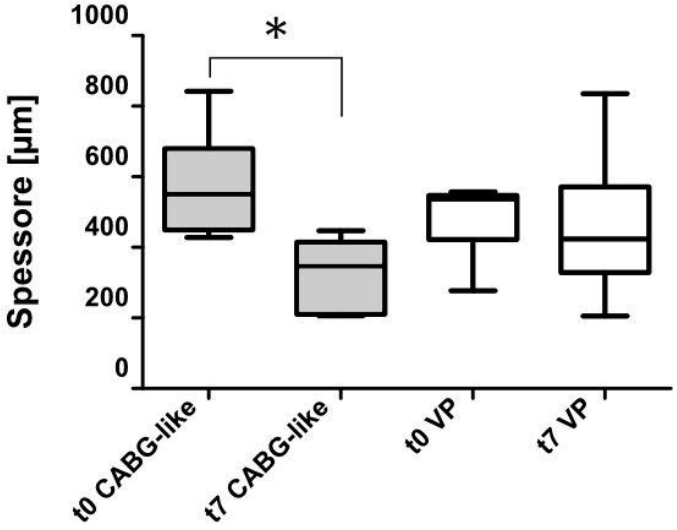


Figura 5.14 R*isultati delle misure dello spessore su campioni stimolati CABG-like e perfusi VP, confrontati con i rispettivi controlli a tempo 0 (* = P < 0.05). Nel gruppo sperimentale t7 VP si osserva che l'estremo superiore rappresenta un outlier rispetto al trend seguito dagli altri campioni.*

È stato inoltre verificato, sempre mediante test non parametrico, che tra le due popolazioni di campioni nativi che costituiscono il controllo di ciascun gruppo di campioni stimolati non esiste differenza statisticamente significativa ($P = 0.2726$), come mostrato in Figura 5.15.

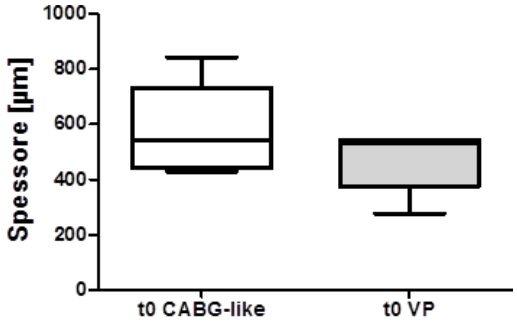


Figura 5.15 *Confronto tra le due popolazioni di campioni nativi.*

L'entità del rimodellamento vascolare è stata, inoltre, quantificata mediante valutazioni morfometriche condotte sul perimetro e sull'area luminale dei campioni stimolati CABG-like e perfusi VP, confrontati con i campioni nativi. La misura del perimetro è stata realizzata mediante un apposito strumento del software ImageJ; le aree, invece, sono state calcolate come area circoscritta dalla circonferenza corrispondente al perimetro, come descritto nel paragrafo 4.3.4.1. In Tabella 5.3 sono riportati i valori misurati; i valori in rosso sono stati esclusi dalla successiva statistica in quanto mancanti del rispettivo controllo a causa dell'impossibilità di effettuare la misura. Le misure di area e perimetro soffrono infatti di alcune criticità legate al processo di inclusione in paraffina che comporta la deformazione del campione e la formazione di pieghe di tessuto.

PERIMETRO				AREA			
CABG-like [mm]		VP [mm]		CABG-like [mm^2]		VP [mm^2]	
t0	t7	t0	t7	t0	t7	t0	t7
7.39	16.54	11.58	7.41	4.35	21.77	10.68	4.37
0.00	15.28	8.26	0.00	9.22	18.57	5.43	1.29
10.76	13.93	7.75	4.03	6.98	15.44	4.78	3.46
9.36	8.33	4.92	6.59	6.10	5.52	1.92	7.80
8.76	11.28	7.87	9.90	0.00	10.12	4.93	9.58
0.00	14.19	8.76	10.97	0.00	16.02	6.10	0.00

Tabella 5.3 *Valori delle misure di perimetro e area dei campioni stimolati e perfusi confrontati con i rispettivi controlli nativi.*

A causa della numerosità di campioni troppo bassa non è stato possibile eseguire un t-test sulle popolazioni di dati che, quindi, sono state confrontate solamente in termini di valor medio e deviazione standard; i risultati sono riportati in Figura 5.16. Ciò che subito emerge è la presenza di un comportamento coerente con le osservazioni riguardanti lo spessore della parete dei vasi. Associata alla diminuzione dello spessore nei vasi sottoposti a CABG si osserva, infatti, un aumento del perimetro, in media pari a 4.45 ± 2.22 mm, e dell'area luminale, in media pari a circa 7.9 ± 3.84 mm^2. Per quanto riguarda i campioni perfusi, invece, non si osservano cambiamenti altrettanto evidenti con una riduzione del perimetro pari a 0.41 ± 0.61 mm e dell'area pari a 0.34 ± 0.5 mm^2.

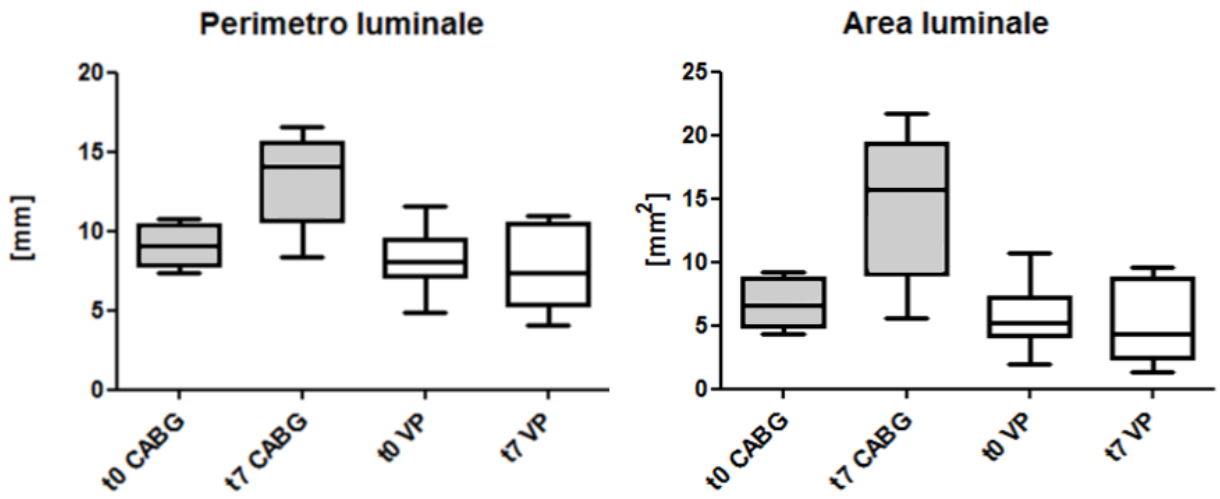


Figura 5.16 *Risultati delle misure di perimetro e area luminale dei campioni sottoposti a stimolazione CABG-like e a perfusione confrontati con i campioni nativi.*

Considerando quanto osservato nei risultati delle analisi morfometriche appena descritti, ciò che emerge è l'effettiva presenza di rimodellamento e riorganizzazione delle strutture caratteristiche della parete dei vasi mantenuti in condizioni arteriose per 7 giorni all'interno dell'EVCS. In questi campioni si è osservato, infatti, che pattern pressori arteriosi comportano la riduzione dello spessore della tunica media del vaso ed un aumento del lume del vaso, probabilmente correlati a fenomeni proliferativi a carico delle SMC ed alla riorganizzazione della parete vascolare connessa a questi fenomeni. I risultati ottenuti trovano conferma nei lavori di Voisard et. al e di Saucy et. al, descrtitti nello stato dell'arte. Nello studio di Voisard [5] la stimolazione pressoria pulsatile nel range 80-130 mmHg di segmenti di vena safena umana ha comportato la riduzione dello spessore della tunica media, identificata mediante colorazione di Van Gieson; i campioni di controllo perfusi in condizioni venose hanno mostrato invece, il mantenimento della morfologia tipica dei vasi nativi. Nello studio di Saucy [4], a seguito del mantenimento in coltura di segmenti di vena safena umana in condizioni di stimolazione caratterizzate da valori pressori pulsatili nel range 40-80 mmHg e portata pari a 120 ml/min, con valori di *shear stress* tipici dell'abiente arterioso (0.9-1.5 Pa), è stata osservata una significativa ($P < 0.001$) diminuzione dello spessore della tunica media e, contemporaneamente, lo sviluppo significativo ($P < 0.001$) di neointima. In nessuno dei campioni compresi nella campagna sperimentale descritta nel presente lavoro di tesi è stato osservato sviluppo di neointima; una possibilie spiegazione potrebbe risiedere nell'assenza di sforzi di taglio alla parete nelle condizioni di stimolazione ricreate dal nostro sistema.

5.3.2.1 Rimodellamento dei *vasa vasorum*

L'osservazione dei preparati istologici ha portato, inoltre, all'individuazione di un rimodellamento morfologico anche a livello dei *vasa vasorum* nei campioni sottoposti a stimolazione CABG-like. Come si può osservare chiaramente in Figura 5.17, in seguito alla stimolazione del campione in condizioni CABG-like i *vasa vasorum* presentano dimensioni maggiori del lume e dello spessore della parete e si osserva un significativo aumento della cellularità. Viceversa, in seguito a perfusione venosa l'aspetto dei *vasa vasorum* si mostra pressoché inalterato rispetto al campione nativo.

Allo stato attuale, presso in LIT del Centro Cardiologico Monzino, sono in corso ulteriori analisi volte a chiarire le origini e le implicazioni di questo fenomeno. Tuttavia, una possibile spiegazione del fenomeno potrebbe risiedere nell'adattamento dei *vasa vasorum*, deputati all'irrorazione della vena, alle modificazioni morfologiche a cui la vena va incontro in seguito alla stimolazione in condizione di regime pressorio arterioso.

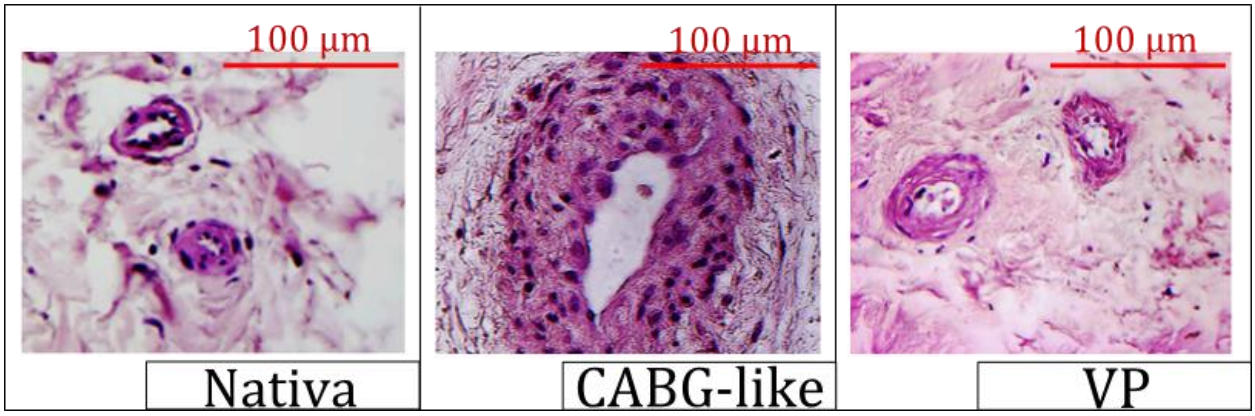


Figura 5.17 *Immagini ottenute al microscopio ottico ad ingrandimento 40X di sezioni di vena safena umana sottoposta a colorazione H/E; si notano le modificazioni morfologiche dei vasa vasorum in condizioni CABG-like e VP rispetto al vaso nativo.*

5.3.3 Proliferazione cellulare

In seguito all'analisi morfologica della parete del vaso, le valutazioni si sono concentrate sugli effetti di stimolazione e perfusione sulla proliferazione delle cellule residenti del tessuto. In particolare, attraverso analisi immunoistochimiche volte all'identificazione del marcatore Ki67 è stata valutata la proliferazione cellulare nelle due condizioni di coltura rispetto ai vasi nativi; il parametro di confronto è stato il rapporto tra il numero di cellule marcate con Ki67 (proliferanti) e il numero di cellule totali. La presenza di fenomeni proliferativi, riscontrati nei campioni di entrambi i gruppi sperimentali,

inoltre, prova che le cellule dei vasi perfusi e stimolati si sono mantenute vitali durante il periodo di coltura.

Per quanto riguarda i campioni perfusi in condizioni venose, in Figura 5.18-a e -b sono riportate due immagini rappresentative della colorazione su vaso nativo e su vaso posto in coltura (condizioni VP); si possono osservare, indicate da frecce nere, le cellule marcate con Ki67 che presentano una colorazione scura, tendente al nero, rispetto alle cellule colorate con ematossilina, dall'aspetto violaceo. Ciò che si osserva, a livello puramente qualitativo, è la presenza di un numero di cellule che esprimono il marcatore Ki67 paragonabile tra il campione perfuso e il campione nativo. Per ogni campione, sono state selezionate 5-6 aree della zona subluminale sulle quali è stata effettuata la conta manuale del numero di cellule totali e di cellule positive per Ki67; i risultati dell'operazione di conta sono riportati in Tabella 5.4.

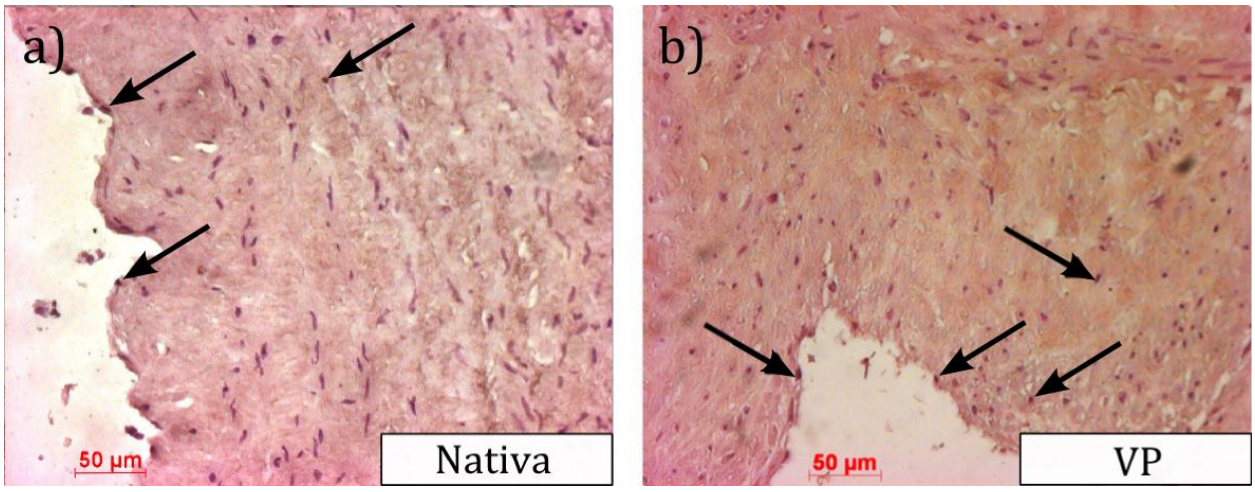


Figura 5.18 *Esempio di colorazione per Ki67 sulla sezione istologica di un vaso nativo (a) e di un vaso perfuso (b). Le frecce nere indicano le cellule positive per il marcatore Ki67, che mostrano colorazione scura, tendente al nero, rispetto alle cellule marcate con ematossilina dall'aspetto violaceo.*

Numero cellule totali (VP)						Numero cellule Ki67+ (VP)					
SV 83		SV 84		SV 92		SV 83		SV 84		SV 92	
t0	t7	t0	t7	t0	t7	t0	t7	t0	t7	t0	t7
150	223	102	144	72	33	55	52	29	45	22	19
228	231	109	110	80	52	93	47	30	37	32	18
152	144	93	195	104	14	51	55	31	31	35	6
163	205	105	180	76	36	57	48	32	45	33	24
217	222	107		87	24	65	98	19		32	19

Tabella 5.4 *Risultati delle operazioni di conta cellulare sugli n=3 campioni perfusi sottoposti ad immunoistochimica per Ki67 e sui rispetti controlli nativi.*

Per ogni campione è stata calcolata la media delle cellule contate nelle aree selezionate e, sui valori medi, è stato calcolato il rapporto tra il numero delle cellule marcate Ki67 e il numero delle cellule totali, i dati sono riportati in Tabella 5.5.

Ki67+/Tot (VP)	
t0	t7
0.35	0.3
0.28	0.26
0.37	0.56

Tabella 5.5 *Rapporto tra il numero di cellule positive a Ki67 e il numero delle cellule totali nei 3 campioni perfusi sottoposti ad immunoistochimica e nei rispettivi controlli nativi.*

I dati sono stati quindi analizzati usando il test non parametrico appaiato di Wilcoxon che ha mostrato l'assenza di una differenza significativa (P = 0.7038) del rapporto tra il numero delle cellule marcate Ki67 ed il numero di cellule totali che è aumentato circa del 12% nei campioni perfusi in condizioni venose rispetto ai nativi.

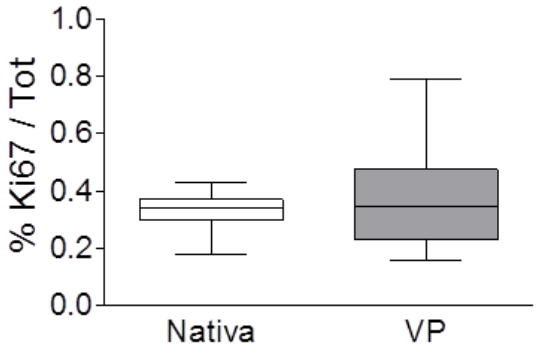


Figura 5.19 *Risultati del confronto del rapporto cellule marcate con Ki67 / cellule totali tra i campioni perfusi e i nativi.*

Questo risultato implica l'assenza di un aumento dei fenomeni proliferativi cellulari all'interno della parete del vaso, in seguito alla perfusione in condizioni venose, rispetto alle condizioni native.

Viceversa, per quanto riguarda i campioni sottoposti a stimolazione CABG-like, si osserva già da un punto di vista solamente qualitativo, la presenza di un numero significativamente maggiore di cellule che esprimono il marcatore Ki67 (Figura 5.20-b), rispetto al campione nativo (Figura 5.20-a).

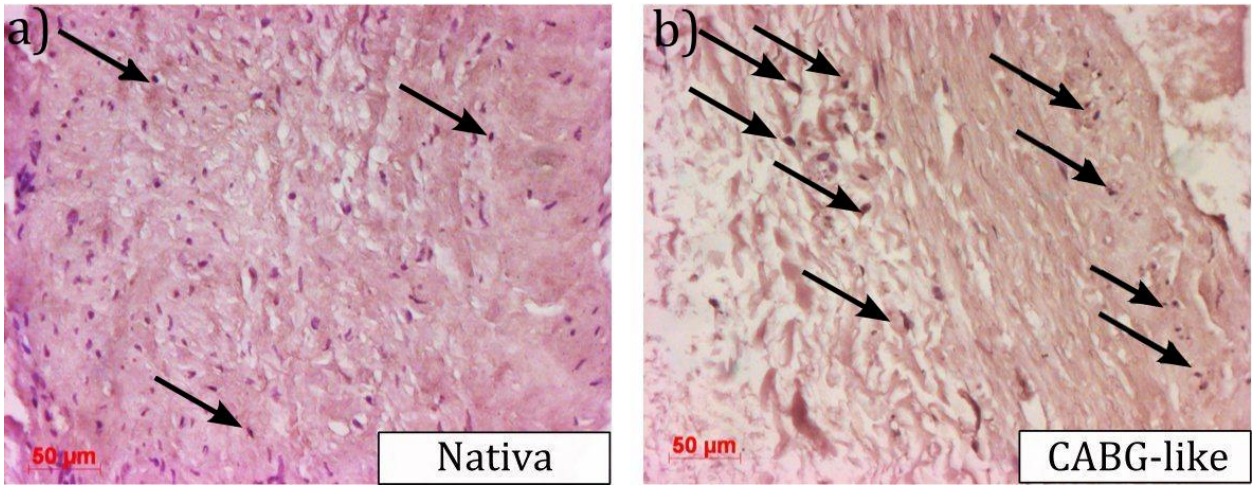


Figura 5.20 *Esempio di colorazione per Ki67 sulla sezione istologica di un vaso nativo (a) e di un vaso stimolato in condizioni CABG-like (b).*

In Tabella 5.6 sono riportati i risultati delle operazioni di conta cellulare sui campioni stimolati in condizioni CABG-like e sui nativi.

Numero cellule totali (CABG-like)						Numero cellule Ki67+ (CABG-like)					
SV 88		SV 92		SV 94		SV 88		SV 92		SV 94	
t0	t7	t0	t7	t0	t7	t0	t7	t0	t7	t0	t7
71	38	72	29	205	47	9	18	22	14	49	18
24	33	80	20	191	53	6	16	32	9	30	22
54	57	104	39	193	22	20	25	35	18	38	19
121	38	76	22	149	67	21	15	33	10	37	36
26	42	87	49	187	63	8	23	32	20	68	31
15	72		30	167	72	4	35		7	41	25

Tabella 5.6 *Risultati delle operazioni di conta cellulare sugli n=3 campioni stimolati sottoposti ad immunoistochimica per Ki67 e sui rispetti controlli nativi.*

Per ogni campione è stata calcolata la media delle cellule contate nelle aree selezionate e, sui valori medi, è stato calcolato il rapporto tra il numero delle cellule marcate Ki67 e il numero delle cellule totali, i dati sono riportati in Tabella 5.7.

Ki67+/Tot (CABG-like)	
t0	t7
0.25	0.47
0.37	0.42
0.24	0.51

Tabella 5.7 *Rapporto tra il numero di cellule positive a Ki67 e il numero delle cellule totali nei 3 campioni stimolati sottoposti ad immunoistochimica e nei rispettivi controlli nativi.*

I dati sono stati analizzati usando il test non parametrico appaiato di Wilcoxon; è emersa la presenza di una differenza statisticamente significativa ($P < 0.0001$) del rapporto tra il numero delle cellule marcate Ki67 ed il numero di cellule totali, che è aumentato del 62.8% circa nei campioni stimolati rispetto ai nativi (Figura 5.21). Questo risultato evidenzia la presenza di intensi fenomeni proliferativi all'interno della parete dei vasi in seguito all'applicazione di pattern di stimolazione arteriosi simili a quelli sperimentati dal vena nel CABG; questi fenomeni, sono probabilmente responsabili delle modificazioni morfologiche osservate nella parete dei vasi stimolati.

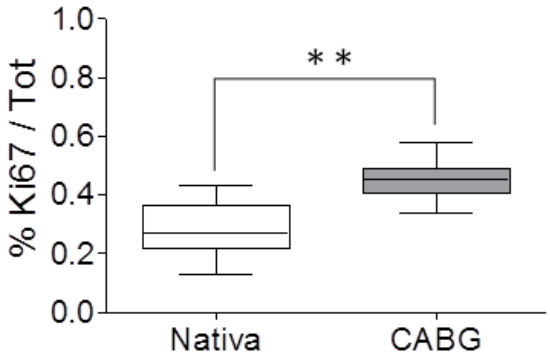


Figura 5.21 *Risultati del confronto del rapporto cellule marcate con Ki67 / cellule totali tra i campioni stimolati e i nativi (** = P < 0.0001).*

Un simile aumento della proliferazione cellulare in seguito alla stimolazione in condizioni arteriose è riportato anche in lavori di letteratura. Saucy et al. [4] osservano un aumento pari al 8.2% del numero di cellule Ki67 positive nei campioni mantenuti in coltura in condizioni di stimolazione, differenti da quelle realizzate con il nostro sistema, caratterizzate da pressione pulsatile nel range 40-80 mmHg e portata pari a 120 ml/min; questo fenomeno è stato osservato in associazione alla riduzione dello spessore della tunica media e allo sviluppo significativo di neointima. Anche nel lavoro di Berard et al. [6],

in cui i segmenti di vena safena umana sono stati sottoposti a condizioni di shear stress arterioso e pressione pulsatile nel range 65-90 mmHg, è stato osservato l'incremento del tasso di proliferazione cellulare nei campioni stimolati rispetto al controllo, tuttavia il fenomeno non è stato quantificato e i dati riportati dagli autori sono solamente qualitativi.

In conclusione, le analisi svolte su campioni di vena safena in seguito alla coltura hanno mostrato che l'applicazione di pattern pressori pulsatili, tipici dell'ambiente arterioso, comporta un aumento significativo dello spessore della tunica media, associato ad un incremento della proliferazione cellulare nell'area subluminale dei campioni. Questi risultati trovano conferma in valori di letteratura in cui si osserva, però, anche uno sviluppo di neointima associato ai fenomeni sopracitati; la motivazione di questa discrepanza nei risultati potrebbe risiedere nella tipologia di stimolazione applicata nel presente lavoro di tesi, basata solamente su pulsatilità in termini pressori senza generazione di sforzi di taglio sulla parete del vaso.

6.

Conclusioni e sviluppi futuri

Il presente lavoro di tesi, svolto presso il μBSLab del Politecnico di Milano, in collaborazione con il LIT dell'I.RC.C.S. del Centro Cardiologico Monzino, si inserisce all'interno di un progetto più ampio volto allo studio dei fenomeni cellulari e molecolari alla base del rimodellamento a cui va incontro la vena safena quando impiegata come bypass aorto-coronarico. Il progetto ha previsto lo sviluppo e l'ottimizzazione di un *ex vivo vessel culture system*, realizzato in un lavoro di tesi precedente [7], che consentisse di ricreare i pattern di stimolazione pressoria pulsatile tipici dell'ambiente arterioso. In questo contesto, la finalità del presente lavoro di tesi è duplice: inizialmente, l'attività progettuale è stata dedicata all'ottimizzazione della camera di coltura, al fine di risolverne alcune criticità evidenziate durante l'utilizzo, successivamente, l'attività progettuale è stata dedicata alla realizzazione di una camera di coltura bicompartimentale per condizionare in modo differente l'ambiente intraluminale da quello extra-avventiziale. Al fine di replicare le differenti condizioni ematochimiche che caratterizzano, in termini di concentrazione di O_2, l'interno e l'esterno del vaso, è stato sviluppato un sistema per la deossigenazione del compartimento extra-avventiziale.

La prima parte dell'attività progettuale ha portato alla realizzazione di una nuova camera di coltura in cui sono state risolte le problematiche riscontrate nella versione precedente.

- La nuova geometria del telaio portavaso ne consente una realizzazione alle macchine utensili semplificata e più veloce, la forma squadrata ne aumenta la maneggevolezza in fase di assemblaggio sotto cappa a flusso laminare, soprattutto nelle operazioni di alloggiamento del vaso.
- L'impiego delle cannule metalliche come elemento di connessione per il circuito idraulico si è rilevato ottimale in quanto, essendo l'accoppiamento tra cannule e tappo molto stabile, riduce il rischio di possibili infiltrazioni batteriche dovute al movimento dei tubi.

- L'accoppiamento mediante O-ring tra il tappo e la camera esterna, mutuato dalla versione precedente della camera di coltura, soddisfa le esigenze di maneggevolezza e facilità di assemblaggio sotto cappa a flusso laminare, in accordo con le norme di buona pratica di laboratorio.

La seconda fase del lavoro di progettazione ha portato alla realizzazione di una camera bicompartimentale che consente la separazione dell'ambiente intraluminale da quello extra-avventiziale mediante l'utilizzo di due reservoir distinti. In particolare è stata realizzata una configurazione in cui il secondo reservoir viene collocato all'interno del primo, realizzando così la compartimentazione desiderata e, contestualmente, riducendo il volume di priming complessivo del sistema. Come nella versione monocompartimentale ottimizzata della camera di coltura, il telaio portavaso presenta una forma squadrata, che ne aumenta la maneggevolezza sotto cappa, e la connessione del circuito idraulico è stata realizzata impiegando cannule metalliche. Anche in questa versione è stato mantenuto l'accoppiamento mediante O-ring tra il tappo e la camera esterna.

La camera bicompartimentale è stata accoppiata ad un sistema di deossigenazione finalizzato all'ottenimento di una concentrazione di ossigeno nel compartimento extra-avventiziale pari al 5%; l'attività di progettazione ha portato alla realizzazione di un sistema costituito da un elemento pompante, un modulo deossigenante e un circuito idraulico realizzato con tubi dotati di bassa permeabilità all'O_2.

L'EVCS, completo del sistema di deossigenazione e del sistema di stimolazione, risulta compatto, con ingombri ridotti all'interno dell'incubatore, rendendolo compatibile con le normali attività del laboratorio biologico (Figura 6.1).

La fase di collaudo della tenuta idraulica della camera bicompartimentale e del sistema di ossigenazione non ha mostrato la presenza di trafilamenti di fluido a livello delle connessioni e degli accessi presenti sulla camera di coltura e sul deossigenatore, garantendo un ottimo isolamento del sistema dall'ambiente esterno. Il collaudo funzionale su banco ha mostrato, inoltre, la compatibilità della camera bicompartimentale e del sistema di deossigenazione con il sistema di stimolazione preesistente.

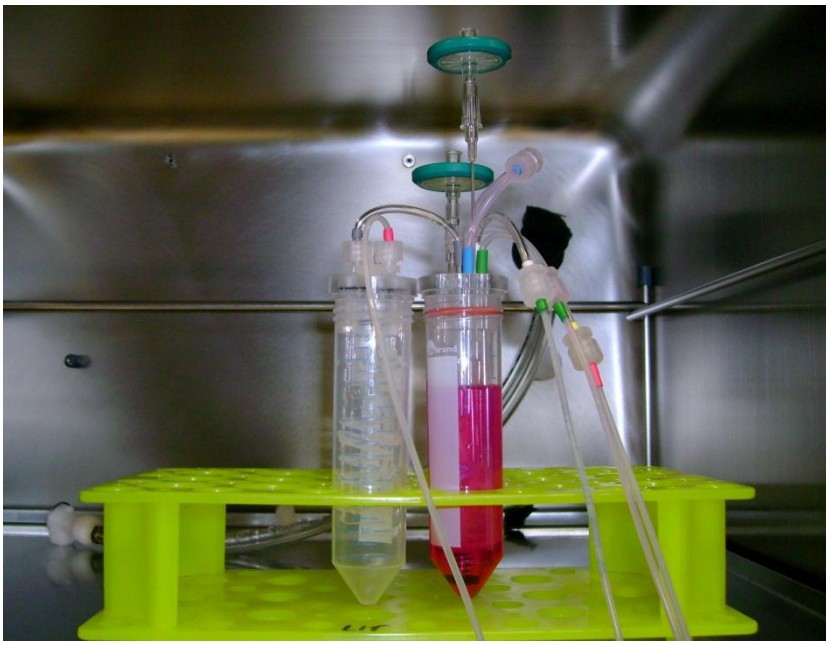


Figura 6.1 *Camera bicompartimentale e deossigenatore posti all'interno dell'incubatore, durante la prova in condizioni di perfusione venosa.*

Le prove di collaudo del modulo deossigenante hanno mostrato il raggiungimento di valori di pO_2 maggiori rispetto a quelli desiderati, indicando la presenza di fenomeni di diffusione di O_2, opposti alla deossigenazione, maggiori di quelli considerati in fase progettuale. Al fine di ottimizzare il sistema di deossigenazione i risultati emersi dalle prove di collaudo potrebbero essere inseriti nel modello matematico per la ridefinizione dei parametri caratteristici del sistema, quali il dimensionamento del modulo deossigenante e la portata di ricircolo. Inoltre, utilizzando due sensori per la misura della pO_2, posti in punti diversi del sistema, sarebbe possibile caratterizzare in modo più esaustivo il sistema, valutando i ΔpO_2 a cavallo dei vari elementi del circuito. Infine, sarebbe stato utile effettuare misurazioni della pO_2 non solo durante le fasi di collaudo su banco ma anche in condizioni di esercizio con il campione biologico. Questo tuttavia non è stato possibile a causa dell'inadeguatezza per le applicazioni in sterilità del sensore di O_2 a disposizione.

Le prove di verifica funzionale del sistema bicompartimentale con campioni di vena safena umana in condizioni di perfusione venosa del campione biologico hanno mostrato il mantenimento della separazione dell'ambiente intraluminale da quello extra-avventiziale, in termini di trasporto di massa attraverso la parete del vaso. Durante la stimolazione del vaso in condizioni CABG-like sono stati osservati fenomeni di perfusione interstiziale attraverso la parete del vaso dal compartimento intraluminale a quello extra-avventiziale, a

partire dal terzo giorno dell'esperimento. Da una quantificazione approssimativa della portata, si è osservato, però, che questo fenomeno può essere trascurato, rispetto alla portata di ricircolo del medium nel compartimento extra-avventiziale. Tuttavia, in seguito ad una quantificazione più precisa, il contributo di questo fenomeno potrebbe essere incluso nel modello progettuale del sistema di deossigenazione. Inoltre, questo fenomeno va interpretato tenendo in considerazione che le dimensioni della molecola d'acqua, di cui è composto il medium di coltura, hanno dimensioni dell'ordine dei nm e che la viscosità del terreno di coltura è significativamente inferiore rispetto a quella del sangue. Un mantenimento più efficace della compartimentazione potrebbe, quindi, essere ottenuto aggiungendo destrano al terreno di coltura che, come riportato in letteratura [36, 40], consente di ottenere valori di viscosità pari a quelli del sangue (3 cP). Inoltre, per ottenere un'evidenza sperimentale significativa dell'efficacia della compartimentazione sarebbe utile effettuare esperimenti di semina dinamica di cellule marcate nel compartimento intraluminale e verificarne, quindi, la distribuzione all'interno del tessuto al termine della prova e, in particolare, verificare che non ci siano cellule circolanti nel comparto avventiziale.

Durante le prove di verifica funzionale con segmenti di vena safena è stato inoltre verificato mediante analisi microbiologiche il mantenimento della sterilità da parte del sistema bicompartimentale fino a 7 giorni di coltura, sia nella prova di perfusione che in quella di stimolazione.

Parallelamente all'attività progettuale è stata condotta, presso il Centro Cardiologico Monzino, una campagna sperimentale estensiva volta allo studio del rimodellamento di segmenti di vena safena umana sottoposti a stimolazione CABG-like (P = 80-120 mmHg) o a perfusione venosa per 7 giorni; questa campagna è stata svolta impiegando il sistema di stimolazione dell'EVCS preesistente e la camera di coltura ottimizzata, descritta in questo lavoro di tesi. Dalle analisi istologiche e di immunofluorescenza, condotte sui campioni in seguito al periodo di coltura, è stata osservata l'integrità della parete vascolare e dello strato endoteliale, ad indicare il mantenimento delle strutture a dell'architettura del campione, in entrambe la condizioni sperimentali. Le analisi morfometriche hanno mostrato una diminuzione statisticamente significativa dello spessore dei vasi sottoposti a stimolazione CABG-like rispetto ai campioni nativi di controllo. Per quanto riguarda i campioni perfusi in condizioni venose non si sono, invece, osservate variazioni

morfologiche significative, in seguito alla coltura. Questi risultati, concordi con quanto riportato in letteratura [4, 5, 31], sembrano indicare la presenza, nei campioni stimolati, di fenomeni proliferativi delle SMC, associati a riorganizzazione delle strutture della parte vascolare. L'osservazione dei preparati istologici ha portato all'individuazione di modificazioni a carico dei *vasa vasorum* dei campioni sottoposti a stimolazione CABG-like; in questi campioni i *vasa vasorum* presentano infatti dimensioni maggiori del lume e dello spessore della parete e mostrano un marcato aumento della cellularità. Questo fenomeno potrebbe essere correlato ad un adattamento dei *vasa vasorum* al rimodellamento a cui va incontro la parete del vaso in condizioni di regime pressorio arterioso. Infine, le analisi immunoistochimiche volte all'identificazione del marcatore Ki67, hanno mostrato un significativo aumento della proliferazione cellulare nei vasi stimolati, mentre nei campioni perfusi il numero delle cellule marcate Ki67 rispetto al totale è rimasto invariato; questo risultato conferma ulteriormente l'ipotesi della presenza di fenomeni proliferativi delle SMC alla base del rimodellamento in condizioni arteriose.

Attualmente, presso il Centro Cardiologico Monzino, sono in corso altre prove, volte ad aumentare la casistica sperimentale; inoltre, sono in programma analisi zimografiche volte a studiare i cambiamenti di espressione e attivazione delle metalloproteasi MMP-2 e MMP-9 che, come è emerso dall'analisi della letteratura [2, 6], sono coinvolte nei fenomeni proliferativi e migratori delle SMC alla base dello sviluppo di neointima.

Oltre alla possibile ottimizzazione del sistema di deossigenazione e alla verifica sperimentale dell'efficacia della compartimentazione, il sistema, sebbene complessivamente si sia dimostrato funzionale potrebbe essere ulteriormente migliorato. Anzitutto, per quanto riguarda la camera bicompartimentale, sarebbe opportuno sostituire l'utilizzo della siringa da 20 ml modificata con un elemento, custom-made, sterilizzabile e di dimensioni adeguate a svolgere il compito di camera interna.

Un significativo avanzamento del sistema di deossigenazione potrebbe consistere nell'integrazione di un sensore ad hoc per applicazioni in condizioni di sterilità nel sistema di monitoraggio e controllo, in questo modo sarebbe possibile agire in retroazione sulla portata di ricircolo o sul lato gas del modulo deossigenante, mediante flussimetri e valvole, in modo da imporre e mantenere il valore di pO_2 desiderato. Questo comporterebbe la conduzione di una ricerca di mercato finalizzata all'individuazione di un sensore per la misura della pO_2 adatto a tale scopo.

Al fine di ridurre ulteriormente gli ingombri, il sistema pompante del circuito di deossigenazione potrebbe essere sostituito con una pompa piezoelettrica, di cui è riportato un esempio in Figura 6.2, in cui sono evidenziate le dimensioni del dispositivo. Inoltre, la pompa piezoelettrica potrebbe essere integrato nel sistema di monitoraggio e controllo e alimentato direttamente dal pc.

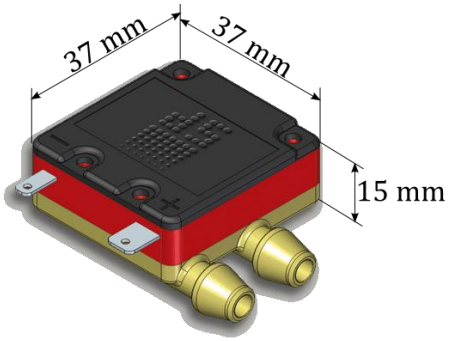


Figura 6.2 Disegno CAD della pompa piezoelettrica (SV P 125 PZ-L, Schwarzer Precision, Essen, Germany).

Una possibile evoluzione del sistema potrebbe consistere nell'integrazione di un simulatore di impedenza coronarica, attualmente in fase di sviluppo presso il µBSLab. In questo modo si otterrebbe una perfusione del vaso in portata, in modo da evidenziare gli effetti della stimolazione meccanica anche in termini di sforzi di taglio alla parete del vaso.

Infine, dal punto di vista delle procedure sperimentali potrebbe essere utile valutare l'evoluzione temporale del rimodellamento della parete vascolare in condizioni CABG-like mantenendo segmenti di vaso provenienti dallo stesso paziente in coltura per periodi differenti. Questo comporterebbe la realizzazione di una configurazione modulare che consenta di effettuare gli esperimenti in parallelo, a tal fine sarebbe necessaria la modifica del sistema del sistema di monitoraggio e controllo in modo da renderlo compatibile con la presenza di più camere di coltura.

In conclusione, il sistema bicompartimentale di coltura realizzato durante il lavoro di tesi si è dimostrato un promettente strumento per lo studio dei fenomeni coinvolti nell'insorgenza del *vein graft disease* della vena safena utilizzata come bypass aorto-coronarico. Questo sistema ha consentito, infatti di mantenere in vita il segmento di vena safena per almeno 7 giorni, di garantire un ambiente privo di contaminazione e di realizzare una compartimentazione dell'ambiente intraluminale ed extra-avventiziale. Il sistema consentirà di riprodurre le differenti condizioni ematochimiche caratteristiche dell'ambiente intraluminale ed extra-avventiziale e potrà essere impiegato in campagne

sperimentali che prevedano un diverso condizionamento biochimico dei due compartimenti o in cui si voglia osservare l'homing di popolazioni cellulari nel versante luminale della vena safena. Infine, mediante l'integrazione con il sistema di stimolazione preesistente, il sistema ha consentito di sottoporre i campioni biologici a condizioni pressorie tipiche dell'ambiente arterioso in modo controllato, standardizzato e riproducibile.

APPENDICE A

Disegni tecnici

Riportiamo i disegni tecnici dei componenti realizzati.

Camera monocompartimentale:

1. Tappo
2. Sponda laterale del telaio portavaso
3. Elemento di giunzione del telaio portavaso
4. Guida per le cannule

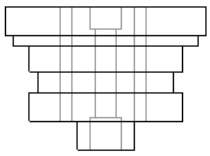
Camera bicompartimentale:

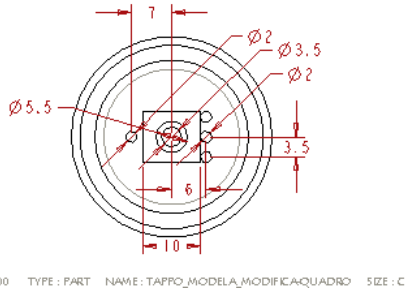
1. Tappo
2. Sponda laterale del telaio portavaso
3. Elemento di giunzione del telaio portavaso
4. Elemento a “pettine”

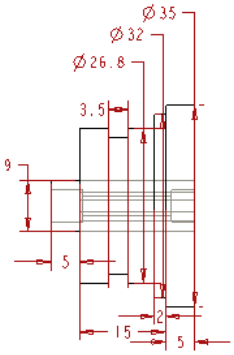
Deossigenatore:

1. Tappo
2. Elemento avvolgi-tubo

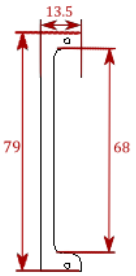
Camera monocompartimentale:
Tappo





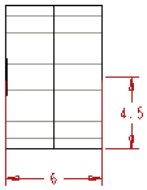


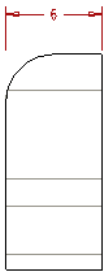
Camera monocompartimentale:
Sponda laterale del telaio portavaso

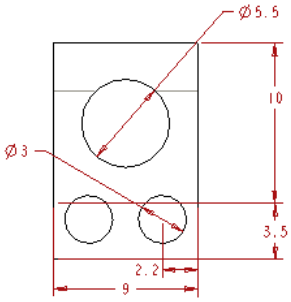


SCALE : 1.000 TYPE : PART NAME : ROSSO-LASER-QUADRO SIZE : C

Camera monocompartimentale:
Elemento di giunzione del telaio portavaso

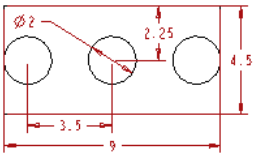


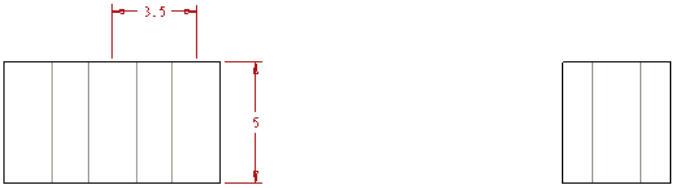




SCALE : 6.000 TYPE : PART NAME : QUADRATOLUER SIZE : C

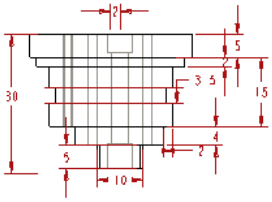
Camera monocompartimentale:
Guida per le cannule

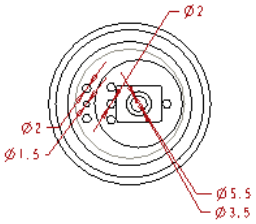


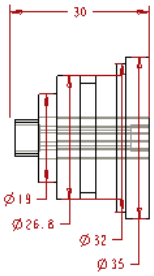


SCALE : 10.000 TYPE : PART NAME : GUIDA SIZE : C

Camera bicompartimentale:
Tappo

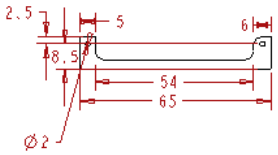






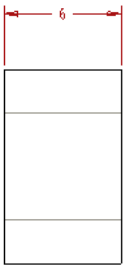
SCALE: 2.000 TYPE: PART NAME: TAPPO SIZE: C

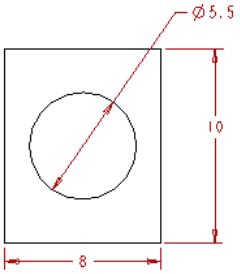
Camera bicompartimentale:
Sponda laterale del telaio portavaso



SCALE: 1.000 TYPE: PART NAME: SPONDA_DX SIZE: C

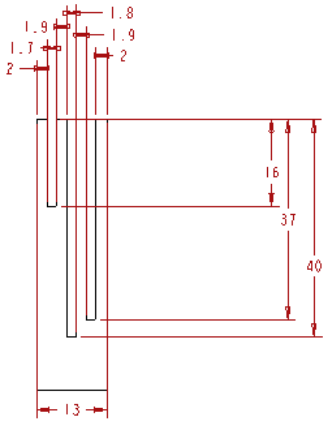
Camera bicompartimentale:
Elemento di giunzione del telaio portavaso

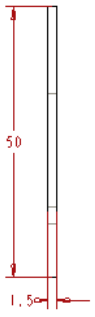




SCALE : 7,000 TYPE : PART NAME : QUADLUERMODIFICATO SIZE : C

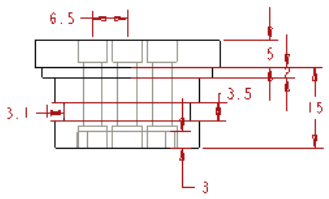
Camera bicompartimentale:
Elemento a “pettine”

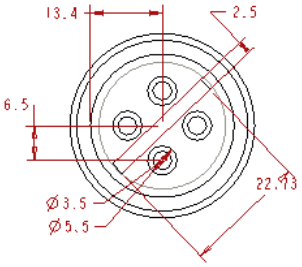


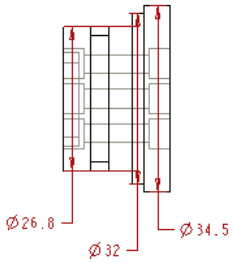


SCALE : 2,000 TYPE : PART NAME : PETTINE SIZE : C

Deossigenatore:
Tappo

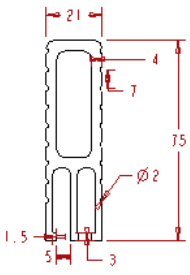






SCALE : 2.000 TYPE : PART NAME : TAPPO_DBOXY SIZE : C

Deossigenatore:
Elemento avvolgi-tubo



SCALE : 1.000 TYPE : PART NAME : AVVOLGI_TUBO SIZE : C

APPENDICE B

Principio di funzionamento del sensore di Clark

Il sensore, o elettrodo, di Clark è un dispositivo elettrochimico che consente di misurare la concentrazione di ossigeno disciolto in un campione. Esso è composto da due elettrodi, un catodo in platino (Pt), posto all'interno di un cilindro isolante, su cui è avvolto un anodo in argento e cloruro d'argento (Ag/AgCl); un secondo cilindro, riempito con una soluzione di cloruro di potassio, racchiude gli altri elementi. Nella parte inferiore del sensore, la punta, è presente una capsula in vetro poroso, rivestita da una membrana polimerica permeabile ai gas. Quando la punta del sensore è immersa nel campione l'O_2 diffonde attraverso la membrana e viene ridotto al catodo; la reazione globale è una ossidoriduzione in cui si ha produzione di corrente in modo direttamente proporzionale alla concentrazione di ossigeno che diffonde attraverso la membrana. In Figura B.1 è riportato un disegno del sensore di Clark in dotazione presso il µBSLab.

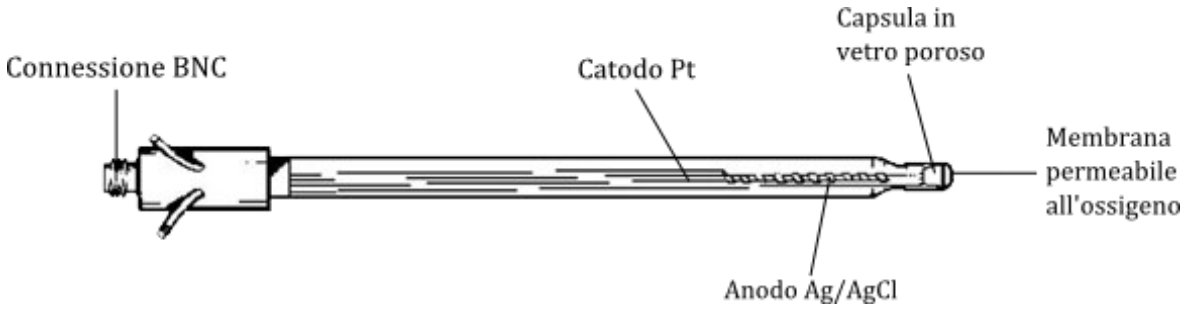


Figura B.1 *Disegno schematico del sensore di Clark utilizzato.*

Problematiche riscontrate nell'utilizzo del sensore di Clark

Durante l'utilizzo in alcune prove preliminari, che non saranno qui descritte, il sensore in dotazione ha mostrato una scarsa stabilità della misura e una forte suscettibilità alla perdita della calibrazione. Queste alterazioni sono, probabilmente, da attribuirsi allo stesso principio di funzionamento del sensore; le correnti che si generano in base alle variazioni di pO_2 sono infatti estremamente piccole (nell'ordine dei nA) e, di conseguenza, molto suscettibili ai disturbi. Per questo motivo, sono stati studiati alcuni accorgimenti per limitare queste alterazioni; anzitutto il cavo di connessione dell'elettrodo alla scatola di controllo è stato schermato mediante un foglio in alluminio e connesso alla massa dello strumento. L'alimentatore della scatola di controllo, fornito dai produttori, è stato sostituito con un alimentatore da banco impostato per generare la tensione desiderata, pari a 9V. Infine, durante gli esperimenti, si è cercato di evitare ogni manovra non necessaria dello strumento che potesse generare segnali indesiderati.

Dai produttori era stata fornita una flow cell in cui poter alloggiare il sensore e connetterlo sulla linea del circuito al fine di effettuare misurazioni real time dell'ossigeno disciolto nel fluido di esercizio (Figura B.2).

Figura B.2 *Flow cell per l'alloggiamento del sensore.*

I fornitori dichiaravano un volume di riempimento della flow cell pari a 150 µl, tuttavia, durante il suo utilizzo, sono stati riscontrati valori di riempimento maggiori, pari a 2 ml. Per questa ragione e a causa della scarsa tenuta idraulica della connessione tra l'elettrodo e la flow cell si è scelto di sostituire quest'ultima. A tal fine è stata realizzata una versione molto semplificato dell'oggetto che ha consentito di diminuire il volume in cui viene effettuata la misura a 0.35 ml (Figura B.3).

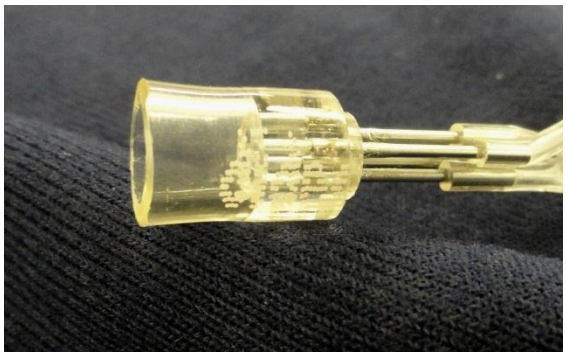


Figura B.3 *Fotografia della flow cell realizzata utilizzando una struttura cilindrica in PMMA, opportunamente dimensionata in base alle dimensioni della punta, e una porzione di tubo in PVC di diametro pari a ¼ di pollice.*

Tenendo in considerazione che la tempistica di risposta del sensore si può definire in termini di

$$\tau = \frac{V}{Q}$$

l'utilizzo di questa flow cell comporta una forte riduzione delle tempistiche del fenomeno.

In Figura B.4 è riportato un esempio delle tempistiche di risposta del sensore, immaginando una totale deossigenazione, al variare del volume del liquido esaminato per una portata fissata pari a 0.1 ml/min.

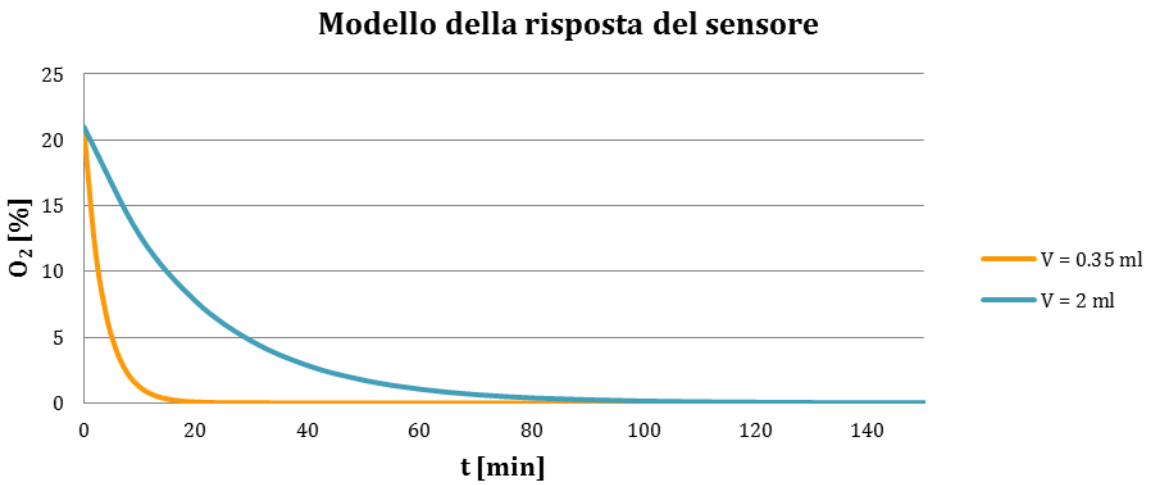


Figura B.4 *Tempistiche di risposta del sensore al variare del volume della flow cell.*

APPENDICE C

Protocollo di assemblaggio della camera di coltura in ambiente sterile

Materiale necessario:

- busta contenente il telaio portavaso (busta 1)
- busta contenente la camera interna (busta 2)
- busta contenente il deossigenatore (busta 3)
- 2 falcon da 50 ml sterili
- scatola contenente il circuito del sistema di stimolazione (scatola 1)
- scatola contenente il circuito del sistema di deossigenazione (scatola 2)
- trasduttore di pressione sterile
- campione biologico
- vessel loop sterile
- 2 pinze sterili
- 1 forbice sterili
- bottiglia da 500 ml di DMEM
- bottiglia da 500 ml di RPMI
- 2 filtri HEPA
- 2 siringa da 50 ml
- 1 siringa da 5 ml
- 1 rubinetto a tre vie sterile
- pipetta P1000 con puntali sterili
- piastre di petri da 15 cm
- guanti da sterilizzare con Et-OH 70%

Assemblaggio del sistema:

1. indossare i guanti e sterilizzarli con Et-OH 70%; operazione da ripetere più volte durante il montaggio
2. prendere il segmento di vena safena e posizionarlo in una petri
3. verificare la presenza di valvole a “nido di rondine” iniettando nella vena qualche ml di medium attraverso la P1000
4. aprire la busta 1 e far scivolare il telaio all’interno di una petri

5. calzare il segmento di vena safena su uno dei connettori presenti sul telaio portavaso assicurando che il posizionamento sia compatibile con l'eventuale presenza presenza di valvole a "nido di rondine"
6. assicurare il segmento di vena safena ai connettori utilizzando il vessel loop e vincolare quest'ultimo alle alette metalliche presenti sul telaio portavaso
7. tagliare il segmento di vena safena ad una lunghezza tale da essere calzato sul secondo connettore presente sul telaio portavaso
8. procedere come al punto 6
9. aprire la busta 2 e afferrare la camera interna
10. posizionare mediante pressione la camera interna nella sua sede nella parte inferiore del tappo, facendo attenzione a non torcere i tubi in silicone nella parte inferiore del telaio
11. afferrare la falcon privata del suo tappo convenzionale e accoppiarla al telaio portavaso, esercitando una leggera pressione al fine di portare in battuta l'O-ring
12. inserire i filtri HEPA negli appositi port presenti sul tappo
13. aprire la bottiglia contente il medium RPMI e prelevare 18 ml di medium con la siringa da 50 ml
14. introdurre il medium RPMI nella camera interna attraverso il port $IN_{\text{camera interna}}$ presente sul tappo del telaio portavaso
15. aprire la bottiglia contente il medium DMEM e prelevare 20 ml di medium con la siringa da 50 ml
16. introdurre il medium DMEM nell'intercapedine tra la camera interna e la camera esterna attraverso il port $IN_{\text{camera esterna}}$ presente sul tappo del telaio portavaso
17. aprire la scatola 1 contente il circuito del sistema di stimolazione
18. collegare i due connettori verdi liberi (uno presente ad una estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
19. collegare i due connettori blu liberi (uno presente ad una estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
20. collegare i due connettori neri liberi (uno presente ad una estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
21. collegare i due connettori gialli liberi (uno presente ad una estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
22. aprire la connessione tra i due connettori rossi presenti nella circuiteria, inserire tra essi un rubinetto a tre vie e connettervi una siringa da 5 ml, agente come camera di compliance, riempita con 1.6 ml di DMEM e 3.4 ml di aria filtrata
23. aprire la connessione tra i due connettori gialli e inserire tra di essi il sensore di pressione flow-through
24. aprire la scatola 2 contente il circuito del sistema di deossigenazione
25. collegare i due connettori bianchi liberi (uno presente ad una estremità della circuiteria e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
26. collegare i due connettori grigi liberi (uno presente ad una estremità della circuiteria e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
27. aprire la busta 3 e afferrare il deossigenatore

28. afferrare la falcon privata del suo tappo convenzionale e accoppiarla al deossigenatore, esercitando una leggera pressione al fine di portare in battuta l'O-ring
29. aprire la connessione tra i due connettori grigi e inserire tra di essi il deossigenatore.

Si faccia riferimento alla Figura C.1 per maggiore chiarezza e per il codice colore.

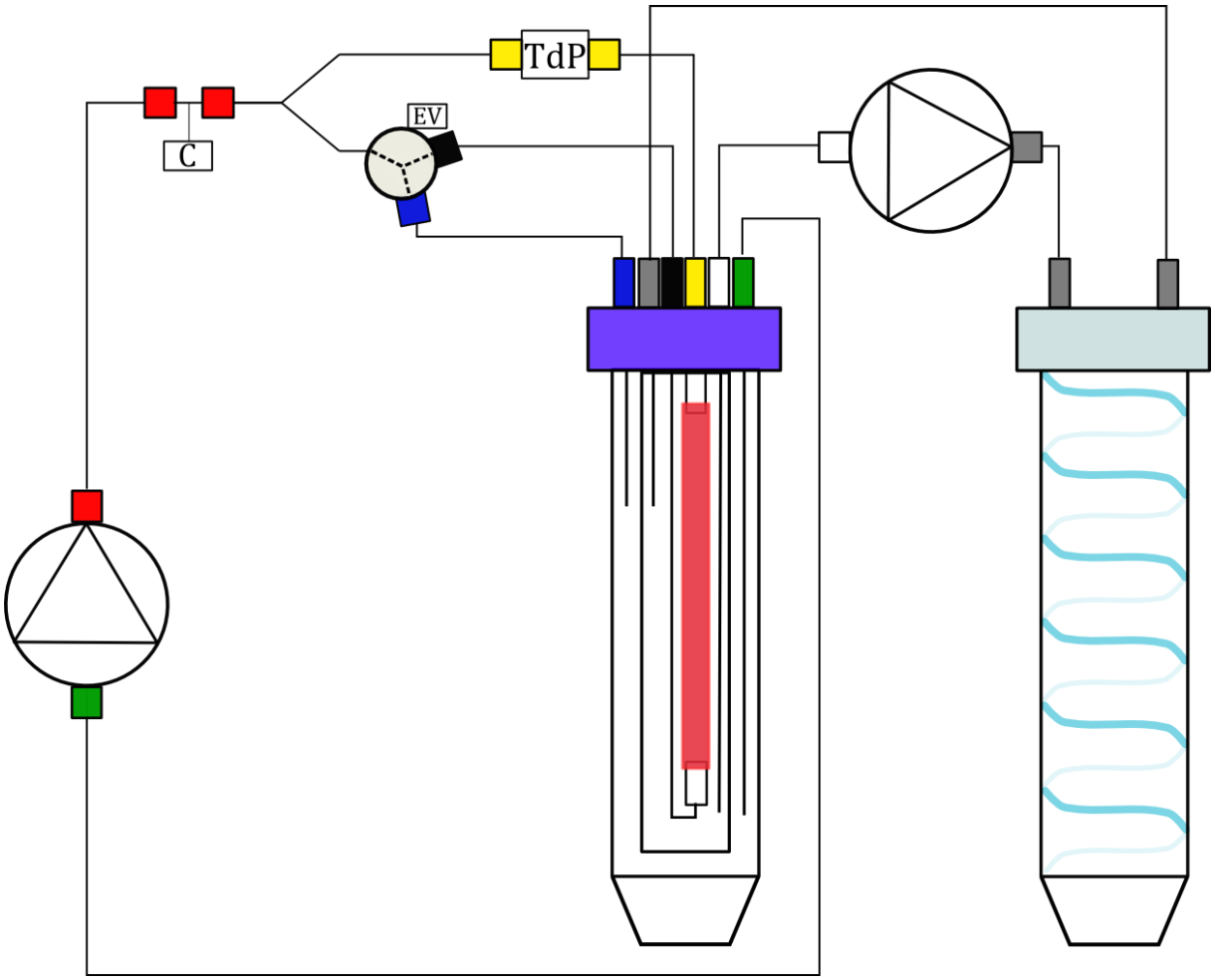


Figura C.1 *Schema grafico delle connessioni tra la circuiteria e i vari accessi della camera.*

Nel caso di assemblaggio del sistema per una prova di perfusione si procede seguendo il protocollo sopra descritto fino al punto 16 e si procede poi come segue:

17. (bis) collegare tra loro il connettore nero ed il connettore blu presenti sul tappo del telaio portavaso
18. (bis) collegare i due connettori verdi liberi (uno presente ad una estremità della circuiteria in silicone e uno presente sul tappo del telaio portavaso)
19. (bis) collegare il connettore rosso libero all'estremità della circuiteria in silicone con il connettore giallo presente sul tappo del telaio portavaso.

Continuare come da protocollo a partire dal punto 24.

APPENDICE D

Protocolli biologici

Colorazione ematossilina/eosina:

- Sparaffinare i vetrini:
  Xilolo 1 6’
  Xilolo 2 6’
  Alcool assoluto 3’
  Alcool 95% 3’
  Alcool 75% 3’
  Alcool 50% 3’
  Acqua demineralizzata 3’
- Ematossilina (Emallume sol. sec. Mayer) 3’
- Passaggio veloce in acqua
- Eosina (200 ml di H_2O demineralizzata + 7 ml di eosina soluzione acquosa madre all’1%) 5’
- Lavaggio
- Disidratazione:
  Alcool 80% 30’’
  Alcool 95% 30’’
  Alcool assoluto 1’
  Lasciar scolare bene
  Xilolo 1 5’
  Xilolo 2 5’
- Montaggio con balsamo del Canada.

Colorazione tricromica di Masson (kit Bio-Optica):

- Sparaffinare i vetrini:
  Xilolo 1 6’
  Xilolo 2 6’
  Alcool assoluto 3’
  Alcool 95% 3’
  Alcool 75% 3’

Alcool 50% 3’
Acqua demineralizzata 3’

- Coprire ogni sezione con 6 gocce del reagente A
- Aggiungere 6 gocce del reagente B 10’
- Asciugare il vetrino senza lavarlo
- Aggiungere 10 gocce del reagente C 4’
- Lavare velocemente in acqua demineralizzata
- Aggiungere 10 gocce del reagente D 4’
- Lavare in acqua demineralizzata
- Aggiungere 10 gocce del reagente E 10’
- Asciugare il vetrino senza lavarlo
- Aggiungere 10 gocce del reagente F 5’
- Lavare in acqua demineralizzata
- Disidratazione:
  Alcool 80% 30’’
  Alcool 95% 30’’
  Alcool assoluto 1’
  Lasciar scolare bene
  Xilolo 1 5’
  Xilolo 2 5’
- Montaggio con balsamo del Canada.

Immunoistochimica con DAB per Ki67:

- Riscaldare le sezioni in stufa a 60°C per 30’
- Preriscaldare la soluzione di sodio citrato fino a bollore
- Reidratare le sezioni:
  Xilolo 1 6’
  Xilolo 2 6’
  EtOH 100% 3’
  EtOH 95% 3’
  EtOH 75% 3’
  EtOH 50% 3’
  ddH_2O 3’
- Smascheramento dell’antigene: 15’ in microonde a 750 watt in tampone citrato (10 mM Sodio citrato, 0.05% tween 20 a pH6)
- Diluire con acqua demineralizzata e far raffreddare 30’
- Contornare le sezioni con la pap-pen

- Incubare le sezioni in H_2O_2 3%, 0.1% NaN3 20'
- Lavaggio rapido in PBS
- Bloccare con stock serum (kit) 30' RT
- Lavaggio rapido in PBS
- Blocco biotina/avidina:
  Blocco avidina D 15' RT
  Lavaggio rapido
  Blocco biotina 15' RT
  Lavaggio rapido
- Incubazione anticorpo primario: Ki67 (Abcam, Cambridge, UK, ab15580), 1:200 in stock serum, 1h RT
- Lavaggio in PBS 5'
- Incubazione anticorpo secondario: ab II° del kit, 1:200 in PBS, 30' RT
- Preparare vectastain ABC reagent: diluire reagente A 1:100 in PBS, agitare bene, aggiungere reagente B 1:100, lasciare a RT 30' prima dell'uso
- Lavaggio in PBS 5'
- Incubare 30' con vectastain ABC reagent a RT
- Lavaggio in PBS 5'
- Incubazione con DAB (SK-4100, Vector Laboratories):
  Diluire in ddH_2O
  Buffer solution 1:50
  DAB solution 1:25
  H_2O_2 solution 1:100
  Ni solution 1:50
- Guardare al microscopio per il tempo esatto di incubazione
- Lavaggio in PBS 5'
- Incubare in Ematossilina 8''-15''
- Lavare bene in acqua cambiando l'acqua più volte 10'
- Deidratare velocemente:
  EtOH 80% pochi secondi
  EtOH 95% pochi secondi
  EtOH 100% 1'
  Xilolo
- Montare con balsamo del Canada.

APPENDICE E

Referti delle analisi microbiologiche

Di seguito sono riportati i referti delle analisi microbiologiche effettuate sui campioni di medium prelevati durante la coltura al fine di verificare il mantenimento della sterilità.

Centro Cardiologico
Monzino

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
Via Parea 4 20138 Milano
T +39 02.58002.1 W www.cardiologicomonzino.it

Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS
Servizio di Medicina di Laboratorio

Responsabile F.F. Dr.ssa Monica Raggi

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il **31-01-2013**
Pagina 1 di 2

Richiesta n. **00709557**
SIG. **BIOREATTORE VERSIONE II**
NATO **24-01-2013** Sesso **M**
Data accettazione **24-01-2013**
BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

MICROBIOLOGIA

Esame colturale da tessuto 80124838

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 0 - Terreno bianco

Esame colturale da tessuto 80124839

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 0 - Terreno rosso

Esame colturale da tessuto 80124840

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 1 - Camera esterna

Esame colturale da tessuto 80124841

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 1 - Camera interna

Referto firmato digitalmente il 31-01-2013 alle 08:41
Dr. RIGGIO DANIELA

Centro Cardiologico
Monzino

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
Via Parea 4 20138 Milano
T +39 02.58002.1 W www.cardiologicomonzino.it

Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS
Servizio di Medicina di Laboratorio

Responsabile F.F. Dr.ssa Monica Raggi

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il **31-01-2013**
Pagina 2 di 2

Richiesta n. **00709557**
SIG. **BIOREATTORE VERSIONE II**
NATO **24-01-2013** Sesso **M**
Data accettazione **24-01-2013**
BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

Esame colturale da tessuto 80124842

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 3 - Terreno rosso

Esame colturale da tessuto 80124843

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 3 - Terreno bianco

Esame colturale da tessuto 80124844

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 7 - Terreno rosso

Esame colturale da tessuto 80124845

Esame microscopico Non eseguito
Esame colturale Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

SV106 Tempo 7 - Terreno bianco

Referto firmato digitalmente il 31-01-2013 alle 08:41
Dr. RIGGIO DANIELA

Centro Cardiologico
Monzino

Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
Via Parea 4 20138 Milano
T +39 02.58002.1 W www.cardiologicomonzino.it

Centro CARDIOLOGICO Monzino - IRCCS
Servizio di Medicina di Laboratorio

Responsabile F.F. Dr.ssa Monica Raggi

Tel. 02-58002590 Fax 02-58002320

Indirizzo

Tel.

Referto stampato il **08-03-2013**

Pagina 1 di 1

Richiesta n. **00716126**
SIG. **BIOREATTORE II SAFENE**
NATO Sesso
Data accettazione **01-03-2013**
BIO

Analisi	Risultato	Unita' di misura	Valori di riferimento	Metodica

Gli esami contrassegnati con # sono eseguiti presso "Diagnostica e Ricerca San Raffaele"

MICROBIOLOGIA

Esame colturale da tessuto 80126691

Esame microscopico	Non eseguito
Esame colturale	Negativo per la ricerca di germi aerobi anaerobi e miceti

Bioreattore II SV111 tempo 1

Referto firmato digitalmente il 08-03-2013 alle 07:49
Dr. RATTO ALESSANDRA

APPENDICE F

Risultati delle misure di spessore

Di seguito sono riportati i valori di spessore della parete misurati per le analisi morfometriche.

VP		VP		VP		VP	
SV 82 t0 [µm]		SV 82 t7 [µm]		SV 83 t0 [µm]		SV 83 t7 [µm]	
405.12	369.9	329.03	580.34	477.82	444.12	543.49	822.41
533.98	383.74	367.41	583.33	404.29	361.65	599.52	960.67
462.47	604.69	338.3	535.5	331.45	524.48	606.39	1168.09
384.93	625.87	330.79	551.62	338.94	585.98	659.42	1027.69
383.4	631.42	381.97	567.85	377.06	684.32	637.36	755.22
398.8	620.2	363.63	509.65	430.87	692.08	849.07	520.48
530.84	573.31	316.04	557.94	429.08	543.19	956.59	
514.85	586.83	414.57	588.68	465.4	508.93	775.92	
550.81	548.14	399.05	447.09	558.57	584.3	601.43	
499.23	596.49	375.64	756.3	687.69	605.9	786.14	
549.57	561.89	370.09	834.96	679.59	561.08	990.6	
475.59	520.54	397.57		657.83	566.53	1202.2	
465.07	494.59	400.39		672.06	572.49	859.39	
324.69	297.95	404.47		673.31	557.73	833.29	
392.92		358.21		520.18	441.81	933.09	
312.11		372.51		504.53	592.58	1019.99	
273.45		389.5		456.1	671.22	859.39	
270.65		348.61		445.18	679.97	936.57	
319.35		409.2		608.56	710.34	663.13	
360.47		449.17		444.64	593.88	838.27	
329.34		503.43		459.86	413.21	818.37	
337.07		566.36		475.71		930.1	

VP		VP			VP		VP		
SV 84 t0 [µm]		SV 84 t7 [µm]			SV 85 t0 [µm]		SV 85 t7 [µm]		
336.27	573.75	680.01	487.1	404.62	487.95	686.26	469.4	382.7	362.4
314.44	569.44	647.55	483.78	410.96	440.32	625.59	676.75	310.89	387.77
262.92	575.68	614.9	487.81	423.23	430.36	630.76	487.58	367.03	373.46
338.43	545.62	422.31	464.04	418.84	408.7	625.75	604.25	336.69	352.43
505.94	530.9	452.92	437.8	364.25	538.73	512.18	605.08	374.58	308.1
618.5	523.33	508.57	397.22	509.91	687.98	441.98	614.39	356.7	363.02
530.95	490.61	527.06	402.74	563.78	527.33	663.68	705.31	339.13	347.54
515.61	397.94	508.57	400.73	564.11	544.27	677.23	718.79	319.14	426.49
728.45	393.01	577.4	383.2	602.27	530.02	616.65	637.09	364.51	
644.43	418.87	512.82	381.17	611.6	549.61	632.81	621.5	323.33	
622.9	430.64	486.26	378.91	554.36	490.44	530.04	592.69	307.17	
662.26	409.92	383.83	349.9	560.01	554.01	633.37	543.56	329.74	
685.57	588.49	364.34	338.47	549.28	340.07	612.22	524.78	251.79	
678.81	640.98	402.99	337.59	444.79	402.56	563.04	500.76	235.47	
667.38	659.37	434.72	321.53	442.87	463.34	398.34	219.54	274.1	
550.88	715.41	443.16	320.46		498.02		402.3	304.5	
515.94	727.19	471.61	314.23		534.98		414.46	260.28	
512.5	717.45	494.7	323.75		417.92		479.52	258.14	
529.24	738.62	495.31	352.2		569.01		382.56	317.15	
568.26	679.22	478.7	346.44		625.06		509.44	323.1	
556.62	708.55	503.1	390.95		759.33		450.68	362.5	
577.71	739.23	487.79	401.43		750.79		398.07	324.47	

VP			VP			VP				VP			
SV 91 t0 [µm]			SV 91 t7 [µm]			SV 92 t0 [µm]				SV 92 t7 [µm]			
163.62	295.96	284.22	138.18	243.9	213.42	671.87	535.89	472.53	635.22	391.63	477.07	485.27	499.95
241.74	279.35	319.07	224.81	234.18	185.2	738.58	500.24	491.43	682.19	425.99	539.1	520.28	499.85
237.09	240.79	274.07	235.86	234.19	203.16	727.45	508.35	509.99	607.37	456.5	519.37	473.31	492.77
247.73	284.94	299.05	261.07	231.69	235.58	793.82	533.94	503.98	620.24	515.19	498.23	517.03	450.82
287.45	325.1	306.46	250.9	212.09	205.42	715.18	499.11	538.91	556.81	547.88	481.91	385.86	439.96
277.08	355.47	320.02	266.83	204.58	180.65	564.32	488.03	541.23	517.01	528.65	470.39	381.65	388.51
240.72	188.93	303.86	263.1	190.27	178.69	609.75	448.97	574.13	384.75	465.76	501.3	511.67	393.49
142	276.84	305.16	283.96	180.47	201.43	616.11	471.89	620.93		457.61	500.59	508.04	394.8
116.02	286.89	263.34	277.55	153.64	148.25	552.46	417.25	698.2		375.86	523.59	535.55	416.74
209.32	315.87	277.67	276.24	186.85	169.68	590.02	425.23	717.56		429.08	443.45	474.08	412.62
235.76	280.74	244.31	218.81	163.16	202.11	562.62	445.79	732.83		504.49	463.55	551.45	529.52
252.98	293.63	121.45	278.77	177.64	213.01	590.03	430.64	733.36		414.48	437.7	512.6	467.48
257.24	309.75	227.03	212.26	190.95	195.76	563.29	475.69	750.56		510.77	485.86	529.47	418.48
279.86	329.37	199.36	184.12	171.33		549.14	477.82	733.44		557.69	501.68	539.42	458.29
231.39	310.52		175.09	164.41		497.11	443.9	688.9		575.27	486.81	513.75	471.27
258.91	301.92		235.8	167.59		572.83	437.82	653.47		578.62	488.17	426.72	554.64
241.85	304.38		237.4	194.68		609.56	434.47	636.21		495.93	432.49	450.93	513.61
200.7	311.06		251.24	171.93		590.56	417.61	681.16		501.27	412.89	444.36	479.5
214.07	308.47		240.43	183.67		577.74	413.18	685.02		492.23	393.34	478.97	
272.02	210.14		226.55	212.38		527.46	426.23	686.6		399.5	412.51	493.67	
306.99	258.73		216.91	189.48		525.3	457.35	682.57		358.72	341.05	505.74	
303.18	284.4		221.29	180.19		528.69	438.53	658.92		395.19	487.08	498.72	

CABG-like		CABG-like			CABG-like		CABG-like			
SV 69 t0 [µm]		SV 69 t7 [µm]			SV 73 t0 [µm]		SV 73 t7 [µm]			
593.14	665.72	536.02	484.73	343.55	711.31	411.57	397.53	315.03	290.53	350.5
742.64	784.43	389.07	496.68	363.02	708.37	397.66	362.92	322.35	816.61	351.65
713.03	863.54	431.17	476.82	360.15	689.68	419.98	396.41	307.51	874.44	384.15
947.78	904.48	419.62	450.98	404.3	645.05	509.06	417.05	295.1	585.8	392.83
955.32	945.82	435.51	416.79	437.7	601.85	553.09	413.1	267.15	631.07	399.56
876.89	852.19	443.57	378.75	491.7	571.11	554.21	419.9	274.88	788.2	365.92
972.8	841.81	462.06	454.7	543.8	555.74		408.31	247.04	838.93	329.15
1030.58	777.21	491.53	491.7	587.46	537.76		402.47	267.43	565.2	281.52
1010.69	800.35	443.08	514.77	612.47	459.89		406.29	286.2	615.04	329.16
868.43	764.77	461.49	442.57	607.46	461.85		380.79	214.62	513.6	326.8
858.15	707.16	470.62	443.78	612.8	544.45		374.15	303.03	476.51	340.94
926.32	877.04	532.96	439.92	592.19	544.25		387.56	279.32	418.68	324.22
875.68	904.92	485.14	446.85	579.68	578.35		395.17	220.8	404.62	309.68
881.32	923.99	466.85	358.18	551.69	579.37		389.86	243.57	389	352.73
929.54	830.06	519.47	328.7	546.31	569.87		328.39	279.12	353.19	
983.26	737.65	471	316.82	545.99	594.38		339.86	336.11	324.53	
893.4	745.28	403.93	277.36	523.02	543.5		335.96	372.1	343.93	
772.64	762.41	394.39	312.21	514.48	520.74		348.63	382.01	340.59	
655.48	714	360.67	333.54		294.3		311.94	370.13	323.93	
668.96	716.2	351.42	362.94		260.18		323.18	522.42	287.74	
723.98	708.81	358.79	348.08		425.27		309.93	343.86	355.52	
684.67		446.9	408.69		439.57		317.58	343.44	340.79	

CABG-like			CABG-like			CABG-like					CABG-like		
SV 79 t0 [µm]			SV 79 t7 [µm]			SV 88 t0 [µm]					SV 88 t7 [µm]		
516.27	624.13	657	385.68	442.83	272.44	218.73	413.35	215.32	492.96	496.08	293.68	236.92	189.75
519.61	587.29	642.39	495.57	420.24	292.43	159.55	387.85	392.2	438.96	480.72	283.47	223.05	218.75
481.58	627.32	623.47	531.52	434.15	258.36	219.35	405.28	424.85	425.85	489.78	283.88	187.45	207.18
424.89	700	612.19	490.55	369.97	349.31	238.96	438.28	504.81	457.58	494.67	276.17	189.71	160.14
517.29	764.88	673.41	526.01	412.78	382.8	313.37	436.13	529.84	479.37	497.56	234.42	170.81	208.18
516.1	744.8	692.69	508.62	418.3	368.72	353.11	427.17	497.95	498.3	469.29	228.74	128.35	202.16
420.48	590.54	663.63	468.07	405.94	337.16	357.92	405.6	503.14	503.15	467.31	252.74	117.7	195.62
434.72	631.43	605.87	488.98	407.74	320	346.41	430.15	509.73	511.71	464.28	254.96	127.78	210.02
531.1	532.86	633.92	366.98	334.62	282.25	336.98	433.35	517.47	491.06	490.34	236.6	148.94	289.64
508.17	443.74	680.5	442.33	379	268.81	321.46	415.08	475.65	370.74	476.88	247.53	169.42	190.38
511.87	663.56	681.12	441.47	348.87	274.96	289.66	356.59	327.64	456.5	484.07	312.89	136.82	227.53
506.86	677.1	581.16	360.45	347.51	407.01	323.6	493.49	368.21	487.95	477.92	304.81	167.46	235.47
521.03	677.79	620.39	437.98	386.15	414.87	423.03	502.69	483.2	490.32	432.89	297.11	176.91	212.91
494.36	601.82	689.99	441.32	380.17	401.63	402.97	505.64	536.11	420.29	413.89	343.43	184.61	242.28
622.22	646.9	639.88	409.54	376.97	458.58	403.14	504.52	536.57	464.94	359.83	314.23	232.2	227.14
614.4	642.31	646.47	419.73	361.32	456.67	549.38	480.37	514.3	483.44	392.34	369.69	192.58	233.47
661.92	605.39	685.34	422.16	366.39	449.42	426.27	464.8	526.7	413.68	372.38	346.05	178.76	
678.63	606.15	672.56	444.99	383.76	402.56	565.66	373.89	536.3	458.31	382	308.27	190.66	
618.77	642.88	647.9	475.51	374.48		416.62	421.2	539.75	319.32	293.71	293.18	202.12	
634.94	657.45	678.1	458.72	385.39		559.5	304.99	551.23	488.46	294.87	187.2	203.37	
620.19	663.02	665.85	454.54	367.92		475.18	348.57	539.75	351.26	244.24	196.62	149.32	
623.69	671.11	595.46	430.29	235.38		464.22	349.58	516.01	520.2		201.81	198.68	

CABG-like				CABG-like				CABG-like				CABG-like			
SV 92 t0 [µm]				SV 92 t7 [µm]				SV 94 t0 [µm]				SV 94 t7 [µm]			
671.87	535.89	472.53	635.22	302.52	320.47	358.58	428.2	381.46	283.97	437.93	553.39	216.86	213.08	214.57	201
738.58	500.24	491.43	682.19	376.42	371.57	327.59	405.91	399.44	340.93	436.08	545.16	213.49	190.8	205.91	195.5
727.45	508.35	509.99	607.37	402.53	315.9	342.98	384.83	405.93	372.23	438.73	562.2	185.73	155.94	182.49	255.74
793.82	533.94	503.98	620.24	379.7	334.21	317.63	406.26	388.02	367.57	383.98	546	203.16	280.19	195.11	196.03
715.18	499.11	538.91	556.81	392.14	338.46	301.54	307.37	417.18	374.79	459.92	538.29	215.25	321.51	174.64	188.31
564.32	488.03	541.23	517.01	386.33	322.85	384.39	413.66	375.87	305.58	467.23	489.39	200.64	309	180.81	170.44
609.75	448.97	574.13	384.75	330.2	358.05	403	400.6	372.97	329.54	515.81	497.6	196.42	335.61	142.55	241.95
616.11	471.89	620.93		325.94	270.7	407.21	334.47	387.55	309.36	508.87	523.22	194.01	345.37	155.17	176.44
552.46	417.25	698.2		359.34	327.7	413.09	345.09	380.41	357.99	507.45	493.89	220.65	323.57	187.16	207.16
590.02	425.23	717.56		294.19	316.99	412.6	336.81	360.51	349.75	516.92	451.33	227.63	284.22	197.07	186.37
562.62	445.79	732.83		362.98	343.89	374.4	324.4	363.47	363.95	201.09	322.62	206.67	265.94	207.21	
590.03	430.64	733.36		343.95	315.11	287.67	361.03	387.36	368.33	497.87	295.01	208.79	207.33	195.72	
563.29	475.69	750.56		336.56	336.76	269.12	371.95	428.41	350.83	532.94		192.84	208.67	195.04	
549.14	477.82	733.44		330.55	326.68	317.72	297.78	466.62	366.82	557.08		212.04	190.58	215.12	
497.11	443.9	688.9		351.98	332.24	404.18	354.88	462.81	348.76	559.9		188.34	251.38	210.38	
572.83	437.82	653.47		304.46	314.8	410.28	404.6	448.13	362.86	562.97		182.43	257.83	307.68	
609.56	434.47	636.21		288.36	332.7	385.11	324.26	456.58	394.88	583.33		186.14	273.15	332.07	
590.56	417.61	681.16		260.82	361.06	418.85	392.17	432.1	404.08	584.87		205.32	252.94	312.21	
577.74	413.18	685.02		259.79	342.84	370.38	390.94	379.03	441.62	586.52		200.47	212.57	281.34	
527.46	426.23	686.6		287.63	345.56	469.66	350.65	328.87	443.36	576.01		192.5	233.1	250.87	
525.3	457.35	682.57		298.77	381.81	364.23		337.22	427.17	568.31		200.39	191.37	152.36	
528.69	438.53	658.92		363.62	385.52	396.61		285.19	445.91	531.14		204.01	198.24	211.04	

Bibliografia

1. Muto, A., et al., *Mechanisms of vein graft adaptation to the arterial circulation: insights into the neointimal algorithm and management strategies.* Circ J, 2010. **74**(8): p. 1501-12.
2. Dummler, S., et al., *Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression.* BioMedical Engineering OnLine, 2011. **10**(1): p. 62.
3. Piola, M., et al., *Tools and procedures for ex vivo vein arterialization, preconditioning and tissue engineering: a step forward to translation to combat the consequences of vascular graft remodeling.* Recent Pat Cardiovasc Drug Discov, 2012. **7**(3): p. 186-95.
4. Saucy, F., et al., *Ex vivo Pulsatile Perfusion of Human Saphenous Veins Induces Intimal Hyperplasia and Increased Levels of the Plasminogen Activator Inhibitor 1.* European Surgical Research, 2010. **45**(1): p. 50-59.
5. Voisard, R., et al., *Pulsed perfusion in a venous human organ culture model with a Windkessel function (pulsed perfusion venous HOC-model).* Med Sci Monit, 2010. **16**(11): p. CR523-9.
6. Berard, X., et al., *Role of hemodynamic forces in the ex vivo arterialization of human saphenous veins.* J Vasc Surg, 2013.
7. Bono, N. and L. Casadonte, *Sviluppo di un sistema di coltura di segmenti di vena safena per lo studio ex vivo del vein graft disease*, in *Dipartimento di Bioingegneria*. 2012, Politecnico di Milano: Milano.
8. Klabunde, R.E., *Cardiovascular Physiology Concepts*. 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
9. Burton, A.C., *Physiology and Biophysics of the Circulation* 1965.
10. Guyton, A.C. and J.E. Hall, *Fisiologia Medica*. 2006: EdiSES.
11. Roger, V.L., et al., *Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association.* Circulation, 2012. **125**(1): p. e2-e220.
12. Gulati, R., C.S. Rihal, and B.J. Gersh, *The SYNTAX trial: a perspective.* Circ Cardiovasc Interv, 2009. **2**(5): p. 463-7.
13. Serruys, P.W., et al., *Comparison of Coronary-Artery Bypass Surgery and Stenting for the Treatment of Multivessel Disease.* New England Journal of Medicine, 2001. **344**(15): p. 1117-1124.
14. Lyman, D.J., et al., *Development of Small Diameter Vascular Prostheses.* ASAIO Journal, 1977. **23**(1): p. 253-260.
15. Goldman, S., et al., *Long-term patency of saphenous vein and left internal mammary artery grafts after coronary artery bypass surgery: results from a Department of Veterans Affairs Cooperative Study.* J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(11): p. 2149-56.

16. Teebken, O.E. and A. Haverich, *Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts.* European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, 2002. **23**(6): p. 475-485.
17. Redaelli, A. and F. Montevecchi, *Biomeccanica - Analisi multiscala di tessuti biologici.* 2007.
18. Fung, Y.C., *Biomechanics: Mechanical properties of living tissues.* 1993.
19. Motwani, J.G. and E.J. Topol, *Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention.* Circulation, 1998. **97**(9): p. 916-31.
20. Parang, P. and R. Arora, *Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention.* Can J Cardiol, 2009. **25**(2): p. e57-62.
21. Owens, C.D., *Adaptive changes in autogenous vein grafts for arterial reconstruction: clinical implications.* J Vasc Surg, 2010. **51**(3): p. 736-46.
22. Shukla, N. and J.Y. Jeremy, *Pathophysiology of saphenous vein graft failure: a brief overview of interventions.* Curr Opin Pharmacol, 2012. **12**(2): p. 114-20.
23. Souza, D.S., et al., *Harvesting the saphenous vein with surrounding tissue for CABG provides long-term graft patency comparable to the left internal thoracic artery: results of a randomized longitudinal trial.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **132**(2): p. 373-8.
24. Soyombo, A.A., et al., *Intimal proliferation in an organ culture of human saphenous vein.* Am J Pathol, 1990. **137**(6): p. 1401-10.
25. Porter, K.E., et al., *Human saphenous vein organ culture: a useful model of intimal hyperplasia?* Eur J Vasc Endovasc Surg, 1996. **11**(1): p. 48-58.
26. Mekontso-Dessap, A., et al., *Vascular-wall remodeling of 3 human bypass vessels: organ culture and smooth muscle cell properties.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(3): p. 651-8.
27. Schachner, T., et al., *Paclitaxel treatment reduces neointimal hyperplasia in cultured human saphenous veins.* Eur J Cardiothorac Surg, 2007. **32**(6): p. 906-11.
28. Joddar, B., et al., *Protandim attenuates intimal hyperplasia in human saphenous veins cultured ex vivo via a catalase-dependent pathway.* Free Radic Biol Med, 2011. **50**(6): p. 700-9.
29. Clerin, V., et al., *Mechanical Environment, Donor Age, and Presence of Endothelium Interact to Modulate Porcine Artery Viability Ex Vivo.* Annals of Biomedical Engineering, 2002. **30**(9): p. 1117-1127.
30. Porter, K.E., et al., *The development of an in vitro flow model of human saphenous vein graft intimal hyperplasia.* 1996.
31. Surowiec, *A New Perfusion Culture System Used to Study Human Vein.* 2000.
32. Patterson, M.A., et al., *Shear Force Regulates Matrix Metalloproteinase Activity in Human Saphenous Vein Organ Culture.* Journal of Surgical Research, 2001. **95**(1): p. 67-72.
33. Rey, J., et al., *Comparative assessment of intimal hyperplasia development after 14 days in two different experimental settings: Tissue culture versus ex vivo continuous perfusion of human saphenous vein.* Journal of Surgical Research, 2004. **121**(1): p. 42-49.

34. Miyakawa, A.A., et al., *Human saphenous vein organ culture under controlled hemodynamic conditions.* Clinics, 2008. **63**(5): p. 683-688.
35. Liao, D., et al., *Vascular smooth cell proliferation in perfusion culture of porcine carotid arteries.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008. **372**(4): p. 668-673.
36. Hoenicka, M., et al., *Effects of Shear Forces and Pressure on Blood Vessel Function and Metabolism in a Perfusion Bioreactor.* Annals of Biomedical Engineering, 2010. **38**(12): p. 3706-3723.
37. Golledge, J., et al., *Development of an in vitro model to study the response of saphenous vein endothelium to pulsatile arterial flow and circumferential deformation.* Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997. **13**(6): p. 605-12.
38. Labadie, R.F., et al., *Pulsatile perfusion system for ex vivo investigation of biochemical pathways in intact vascular tissue.* Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 2): p. H760-8.
39. Conklin, *A simple physiologic pulsatile perfusion system for the study of.* 2000.
40. Gusic, R.J., et al., *Shear stress and pressure modulate saphenous vein remodeling ex vivo.* Journal of Biomechanics, 2005. **38**(9): p. 1760-1769.
41. Orr, D.E. and K.J. Burg, *Design of a modular bioreactor to incorporate both perfusion flow and hydrostatic compression for tissue engineering applications.* Ann Biomed Eng, 2008. **36**(7): p. 1228-41.
42. Sasaki, N., et al., *A new method for measuring the oxygen diffusion constant and oxygen consumption rate of arteriolar walls.* Keio J Med, 2012. **61**(2): p. 57-65.
43. SIGMA-ALDRICH, *Product Information, Phenol Red*
44. Oxtoby, D.W., H.P. Gillis, and N.H. Nachtrieb, *Chimica Moderna*. 2005: EdiSES.